



UNIVERSITÀ DI PISA

Corso di laurea in Farmacia

Anno Accademico 2013 – 2014

Titolo:

Studio dei Livelli di Ossitocina e BDNF
nei pazienti con Còrea di Huntington

Candidato:

Roberto Marino

Relatore:

Prof. Gino Giannaccini

Correlatori:

Dr.ssa Lionella Palego

Prof. Antonio Lucacchini

INDICE

LA CÒREA DI HUNTINGTON

| | |
|---|--------------|
| 1.1 Insorgenza e sintomatologia..... | pg 5 |
| 1.2 Basi genetiche..... | pg 11 |
| 1.3 Terapia farmacologica..... | pg 15 |
| 1.4 Neuropatologia..... | pg18 |

OSSITOCINA

| | |
|--|--------------|
| 2.1 Struttura dell'ossitocina..... | pg 20 |
| 2.2 Sintesi dell'ossitocina..... | pg 23 |
| 2.3 Il gene dell'ossitocina..... | pg 28 |
| 2.4 Recettore dell'ossitocina e vie di trasduzione del segnale..... | pg 30 |
| 2.5 Il gene del recettore dell'ossitocina..... | pg 32 |
| 2.6 Ruolo fisiologico..... | pg 33 |
| 2.7 Ossitocina a livello periferico..... | pg 35 |
| 2.8 Ossitocina nel SNC..... | pg 38 |

LE NEUROTROFINE

| | |
|--|--------------|
| 3.1 Formazione delle neurotrofine..... | pg 41 |
| 3.2 I recettori delle neurotrofine..... | pg 46 |

| | |
|---|--------------|
| 3.3 Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF)- Ruolo fisiologico..... | pg 48 |
| 3.4 Sintesi e secrezione del BDNF..... | pg 50 |
| 3.5 Il gene del BDNF umano..... | pg 54 |
| 3.6 Trasporto anterogrado e retrogrado del BDNF..... | pg 57 |

STATO DELL'ARTE

| | |
|--|--------------|
| 4.1 Ossitocina e cognizione sociale nella malattia di Huntington..... | pg 61 |
| 4.2 Il BDNF nella malattia di Huntington..... | pg 64 |

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO

| | |
|----------------------------------|--------------|
| 5.1 Scopo della tesi..... | pg 70 |
|----------------------------------|--------------|

MATERIALE E METODI

| | |
|---|--------------|
| 6.1 Campionamento e prelievi..... | pg 74 |
| 6.2 Valutazione clinica e neuropsicologica..... | pg 77 |
| 6.3 Prelievo ematico..... | pg 79 |
| 6.4 Estrazione dell'ossitocina dal plasma | pg 80 |
| 6.5 Dosaggio EIA dell'ossitocina plasmatica..... | pg 82 |
| 6.6 Trattamento e lisi delle piastrine per l'analisi del BDNF..... | pg 84 |
| 6.7 Dosaggio del BDNF con metodica ELISA..... | pg 85 |
| 6.8 Preparazione della piastra e procedura..... | pg 87 |
| 6.9 Dosaggio proteico con metodo di Bradford..... | pg 91 |

| | |
|-------------------------------------|--------------|
| 6.10 Analisi statistica..... | pg 93 |
|-------------------------------------|--------------|

RISULTATI E DISCUSSIONE

| | |
|--|---------------|
| 7.1 Valutazione neuropsicologica..... | pg 94 |
| 7.2 Livelli ematici di ossitocina | pg 97 |
| 7.3 Livelli intrapiastrinici di BDNF..... | pg 104 |

| | |
|--------------------|---------------|
| CONCLUSIONI | pg 110 |
|--------------------|---------------|

LA CÒREA DI HUNTINGTON

1.1 Insorgenza e sintomatologia

La Còrea di Huntington (HD) è una malattia genetico-degenerativa che si manifesta nella popolazione mondiale con un'incidenza di 4-7 casi ogni 100.000 individui (Ross *et al.*, 2011). Vede alterata la coordinazione muscolare ed un progressivo declino cognitivo, in molti casi accompagnato da problemi psichiatrici.

Il nome di questa malattia deriva dal suo scopritore, il medico inglese George Huntington, che fu il primo a descriverla nel 1872 come una “*chorea*”, termine greco che indica “danza”, per i movimenti involontari degli arti, del viso, del collo e del tronco che si manifestano all'insorgere della malattia.

L'esordio di questa patologia neurodegenerativa avviene in genere in età adulta, fra i 35 ed i 50 anni; più raramente può comparire prima dei 20 anni oppure oltre i 65 anni e in vecchiaia.

La forma giovanile, ad esordio prima dei 20 anni, rappresenta circa il 10% dei casi di HD; di questi, circa il 2% presenta segni di malattia prima dei 10 anni (Rasmussen A *et al.* 2000).

La forma più frequente di HD, con esordio in età adulta, presenta un decorso che può essere suddiviso schematicamente in tre stadi.

Il primo stadio di malattia consiste in una lieve e progressiva riduzione delle performance intellettive dei pazienti, accompagnata

da cambiamenti del tono dell'umore, depressione, ansia, irritabilità, apatia e alterazioni comportamentali.

Questi sintomi possono precedere di mesi o anni la comparsa dei sintomi motori e per questo l'esordio della malattia può essere in alcuni casi non facilmente riconoscibile. Tuttavia, alcune lievi alterazioni motorie, quali un certo impaccio nei movimenti volontari, la presenza di lievi ed occasionali movimenti involontari, miocloni, tic e iperreflessia, o alterazioni dei movimenti oculari possono essere rilevati all'esame neurologico già in questa prima fase.

Nello stadio intermedio, il quadro clinico è caratterizzato dalla comparsa dei sintomi tipici della Còrea, quindi da movimenti involontari rapidi, aritmici ed afinalistici. La distribuzione e la gravità del disturbo coreico possono variare da movimenti appena percettibili, fino a movimenti molto violenti, particolarmente disabilitanti, che interessano tutti i segmenti corporei, con gravi conseguenze sulla qualità di vita del paziente. Con il progredire della malattia, al disturbo coreico si sovrappongono rigidità e bradicinesia (lentezza nei movimenti) che compromettono l'attività motoria volontaria rendendo l'andatura instabile. Inoltre si ha anche compromissione del linguaggio (disartria), accompagnata da difficoltà nella deglutizione (disfagia) e distonia (contrazione muscolare tonica con ripetitivi movimenti di torsione o assunzione di posture anomale); disartria, disfagia e distonia possono,

raramente, essere presenti già nelle prime fasi di malattia, ma rappresentano la caratteristica prominente dello stadio intermedio, dove divengono sempre più evidenti.

Nella fase avanzata il quadro neurologico è caratterizzato da un marcato rallentamento dei movimenti volontari, da pronunciata rigidità e presenza di posture distoniche. I pazienti necessitano di aiuto nelle attività della vita quotidiana, per la deambulazione, per vestirsi, alimentarsi e per la cura dell'igiene personale. Anche il linguaggio diventa molto difficoltoso. La difficoltà a deglutire può richiedere particolari modificazioni alimentari che, nei casi più avanzati, necessita alimentazione tramite PEG ("Percutaneous Endoscopic Gastrostomy"), un tipo di nutrizione artificiale necessaria a quei pazienti che a causa di disturbi neurologici e/o disturbi fisici del primo tratto digerente, non riescono a nutrirsi in autonomia.

Presenta gli stessi vantaggi dell'alimentazione per via parenterale e in più permette il mantenimento della funzionalità intestinale ed una più facile gestione del paziente a domicilio.

Anche se il deficit cognitivo e comportamentale in questo stadio incrementa in modo devastante, i pazienti possono conservare un grado significativo di comprensione della loro condizione. Questo aspetto della malattia riveste sempre più rilievo perché è quello di maggior impatto sulla qualità di vita dei pazienti e dei familiari;

inoltre, è rilevante sottolineare che, in alcuni casi, le alterazioni del profilo cognitivo possono essere già evidenziate 15 anni prima dell'esordio motorio (Paulsen JS, 2008). Il quadro clinico, schematizzato nelle tre fasi sopradescritte, è tuttavia complesso ed eterogeneo, con sovrapposizione di sintomi psichiatrici, psicologici e motori variabili da individuo ad individuo.

È una malattia neurodegenerativa ereditaria dominante: basta che uno solo dei due alleli sia mutato perché si sviluppi la malattia. La HD fa parte di un gruppo di malattie ereditarie dovute ad un tipo particolare di mutazione genica, l'espansione di triplette. A questo gruppo di malattie genetiche appartengono la sindrome dell'X fragile, la distrofia miotonica e le atassie spinocerebrali.

Nel caso particolare della HD, l'espansione è a carico della tripletta CAG (che codifica per l'amino acido glutammina) presente nel primo esone del gene IT15 (Interesting Transcript 15), localizzato sul braccio corto del cromosoma 4 (Gusella JF *et al.*, 1983). Il locus genico codificante per IT15 è molto esteso, con una lunghezza pari a circa 180kb, ed è costituito da 67 esoni dalle dimensioni variabili comprese tra le 48 e le 341 paia di basi. Al terminale 5' del gene, nel primo esone e circa 370 nucleotidi a valle del sito ATG d'inizio della trascrizione, si trova una sequenza trinucleotidica ripetuta, CAG, codificante per l'amminoacido glutammina. La ripetizione costituisce un sito polimorfico nella popolazione, in quanto il numero delle ripetizioni è variabile da individuo ad individuo (da 4

a 35 glutammine). Si è visto a questo proposito che già 36 ripetizioni della tripletta CAG, sono causa dell'insorgenza di alcuni tratti caratterizzanti la malattia.

È stato inoltre evidenziato, se pur con approssimazione, che il numero di ripetizioni di questi residui glutamminici nella proteina è correlato all'età d'insorgenza della malattia in maniera inversamente proporzionale.

Per stabilire se un paziente è affetto da HD o meno viene utilizzata una scala di valutazione chiamata UHDRS (Unified Huntington's Disease Rating Scale) dal gruppo di studio americano Huntington Study Group. I risultati ottenuti vengono interpretati da neurologi altamente qualificati e specializzati.

La scala UHDRS è uno strumento di ricerca sviluppato per fornire una valutazione uniforme delle caratteristiche cliniche dei pazienti con HD. Il questionario UHDRS è stato sottoposto a numerosi test di affidabilità e validità ed è stato utilizzato come misura di esito. Come altri tipi di questionari clinici, questa scala di valutazione per i sintomi della HD prevede un punteggio “soglia” oltre il quale la sintomatologia acquisisce importanza nella diagnosi e nel “follow-up” dei pazienti (Siesling *et al.*, 1998).

La scala UHDRS si avvale di 6 componenti o “items” principali che comprendono:

1. Valutazione motoria
2. Valutazione cognitiva
3. Valutazione del comportamento
4. Scala di indipendenza
5. Valutazione funzionale
6. Capacità totale funzionale (TFC).

L'utilizzazione di questa scala di valutazione evidenzia quindi l'impossibilità di diagnosticare la malattia prima dell'insorgenza dei sintomi psichiatrici e motori.

Il metodo più sicuro da utilizzare per la diagnosi precoce di malattia è chiaramente l'attuazione di uno screening genetico mirato, con la valutazione diretta della presenza del numero di ripetizioni della sequenza CAG codificante per la glutammina sul gene IT15 localizzato sul cromosoma 4.

Tuttavia, questo test, che è il più affidabile, non viene ancora applicato come screening diagnostico nella popolazione generale, perché laborioso e costoso. Viene applicato solo per confermare la diagnosi.

La ricerca neurologica in questo settore si sta anche adoperando per trovare marcatori biologici, o “biomarkers”, che siano in grado di “seguire” il decorso della malattia ovvero, nel migliore dei casi, di prevedere interventi terapeutici mirati al fine di prevenire o ritardare le fasi della HD altamente invalidanti.

1.2 Basi genetiche

L'alterazione genetica riscontrabile nei pazienti con HD è legata, come detto prima, alla variazione del numero di glutammine presenti nella proteina huntingtina (HTT)(Illustrazione 1). Poiché la malattia si presenta solo in pazienti con un numero di glutammine maggiore del normale a carico della HTT, questa viene quindi classificata come una “malattia da poliglutammine”.

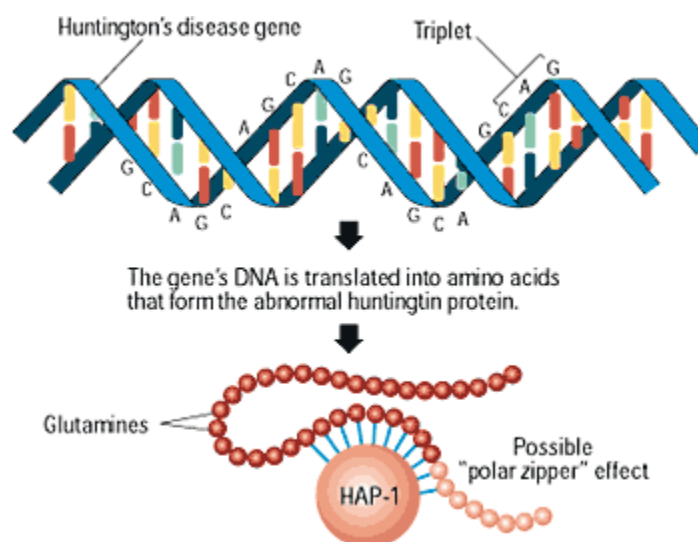


Illustrazione 1: Rappresentazione grafica dell'alterazione che è causa della malattia

Ciò che questa mutazione determina non è ancora chiaro. Le ipotesi più accreditate sono la ridotta efficacia della proteina (“loss of function hypotesis”), l’acquisizione di caratteristiche tossiche (“gain of function hypotesis”) o entrambe.

Le prime osservazioni che hanno seguito il clonaggio del gene dimostravano che l'HTT normale e quella mutata erano equamente distribuite nelle cellule dei pazienti con HD. Dal punto di vista del danno neuronale, l'area cerebrale maggiormente colpita dall'espressione di questa proteina anomala è il corpo striato (Halliday GM *et al.*, 1998; Vonsattel JPG 2008), componente sottocorticale del telencefalo.

Questo rappresenta la stazione di input più importante del sistema dei nuclei alla base.

E' un voluminoso insieme di nuclei che deve il suo nome ad una particolare organizzazione strutturale. È infatti composto da un alternanza di formazioni grigie intersecate da fasci di sostanza bianca che conferiscono alla struttura il particolare aspetto striato.

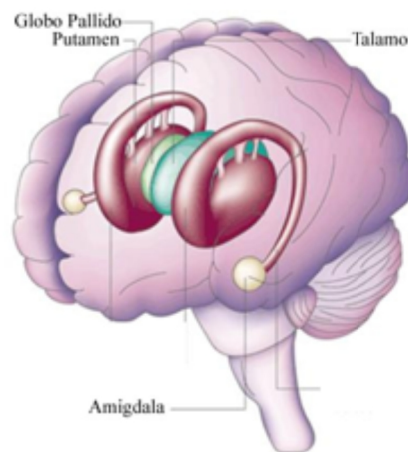


Illustrazione 2: Localizzazione talamica

Lo striato è noto per il suo ruolo nella pianificazione e modulazione dei movimenti ma è coinvolto in una varietà di

processi cognitivi che coinvolgono la funzione esecutiva.

Tenendo conto di questa osservazione, si è andata sempre più accreditando l'ipotesi che la HD fosse una malattia innescata e sostenuta dalla tossicità dell' HTT mutata.

A questo proposito, è stato possibile osservare che in pazienti con HD l'HTT si trova in forma insolubile (Davies SV *et al.*, 1997; DiFiglia M *et al.* 1997), indice di un alterato processamento e conservazione della conformazione nativa.

L'ipotesi della tossicità (Ross CA *et al.*, 2011) viene anche supportata dal fatto che la HD non è l'unica patologia da espansione della tripletta CAG.

Il fatto che in tutti i casi in cui si presenta una sequenza elongata di poliglutammine si riscontri tossicità porta a dedurre che le poliglutammine siano di per sé tossiche.

La ricerca ha così concentrato i suoi sforzi sulla mutazione, onde capire i meccanismi alla base di tale tossicità.

Un primo risultato è stato dimostrare che il tratto poliglutaminico presenta, di fatto una funzione tossica intrinseca.

È stato ampiamente descritto in letteratura che il tratto poliglutaminico, sia in una piccola porzione amino-terminale della proteina HTT, sia in proteine diverse da questa, è in grado di evocare tossicità una volta espresso in modelli animali, o cellulari, o persino in piccoli organismi come la *Drosophila Melanogaster* (il moscerino della frutta).

Si è dunque concluso che la tossicità osservata in presenza di HTT

mutata fosse da attribuire alla sequenza poliglutamminica espansa. Tra i risultati cruciali vi è l'osservazione che HTT subisce un taglio proteolitico da parte di enzimi proteasici appartenenti alla famiglia delle caspasi e, in particolare, che questa attività enzimatica aumenta notevolmente in presenza della mutazione. L'azione delle caspasi porta dunque all'ottenimento di diversi frammenti dell' HTT mutata, che sono così in grado di attraversare la membrana nucleare, e dare origine ad inclusioni.

Indubbiamente attenzione maggiore è stata attribuita allo studio della parte amino terminale contenente il tratto di poliglutammine.

A questo proposito, Max Perutz (Perutz *et al.*, 1994) ha indicato che le poliglutammine si dispongono in modo da formare una struttura a foglietto beta che promuove la formazione di legami con altri frammenti di HTT mutata e con altre proteine ottenendo così degli aggregati nucleari e citoplasmatici in grado di alterare la normale architettura cellulare. Questi aggregati inoltre vanno a legare l' HTT sana impedendole quindi di svolgere le normali funzioni.

In seguito a queste informazioni si è quindi pensato che l' HTT mutata fosse la vera causa dell'insorgenza della malattia.

Altri studi sostengono però che gli aggregati rappresentino un meccanismo di difesa della cellula per proteggersi dalla tossicità indotta dall'espansione di poliglutammine.

Quale sia l'alterazione alla base della HD è quindi ancora in fase di studio.

1.3 Terapia farmacologica

Le attuali terapie farmacologiche per la HD hanno l'obiettivo di contrastare e alleviare i sintomi, non essendo in grado di prevenirne la comparsa né di eliminarne la causa. I farmaci oggi disponibili mirano infatti a diminuire i disturbi psicologici e i sintomi motori, mentre non sono ancora disponibili farmaci che possano agire sul deficit cognitivo.

Depressione, irritabilità, apatia e disturbi ossessivi vengono controllati con farmaci ansiolitici quali le benzodiazepine (es. alprazolam), antidepressivi triciclici (es. imipramina) o antidepressivi di seconda generazione (atipici e inibitori selettivi del re-uptake della serotonina o SSRIs), stabilizzanti dell'umore o anticonvulsivanti (es. valproato di sodio). Questi farmaci vengono spesso usati in combinazione e mostrano buoni risultati sul controllo di sintomi psichiatrici quali soprattutto irritabilità, ansia e depressione. Provocano spesso come effetto collaterale sedazione e assuefazione.

In alcuni casi, i farmaci usati per il controllo dei disturbi dell'umore hanno anche effetto sulla disfunzione motoria che caratterizza la malattia. In particolare l'efficacia sul controllo dei movimenti di alcune benzodiazepine e di alcuni inibitori della trasmissione nervosa a livello centrale (inibitori della trasmissione di dopamina e glutammato) è documentata da anni di utilizzo. Sono purtroppo altrettanto noti anche i possibili pesanti effetti collaterali quali

sintomi Parkinson-simili, disturbi dell'equilibrio, apatia e/o distonia tardiva.

Attualmente, buoni risultati con minori effetti secondari possono essere ottenuti con gli antidepressivi atipici o di seconda generazione (es Trazodone, Venlafaxina).

Per il controllo dei sintomi psicotici nei pazienti con HD, gli antipsicotici atipici (es. olanzapina) sono preferenziali; infatti gli antipsicotici tradizionali quali i neurolettici (es. aloperidolo) sono di largo impiego per il controllo del disturbo psicotico ma possono presentare gravi effetti collaterali di tipo motorio, sindrome parkinsoniana, discinesia tardiva e depressione, peggiorando l'evoluzione della sintomatologia nel tempo.

Le strategie del domani mirano ad una terapia che protegga i neuroni dalla morte cellulare o ne ritardi la degenerazione attraverso approcci farmacologici o terapie riparative, quali il trapianto cellulare, contrastando in tal modo l'insorgere e il progredire della malattia.

Sono in corso studi di efficacia e tossicità di nuovi potenziali farmaci per l'HD sia sull'uomo, sia sugli animali.

Particolare interesse è rivolto a sostanze con attività non mirata alla trasmissione a livello centrale, quali il coenzima Q10, la creatina e il Miraxion (acido eicosapentaenoico, EPA). Lo studio CARE-HD coordinato dall'Huntington Study Group (HSG) e dal dottor Kiebert (1996) negli Stati Uniti ha mostrato su un ridotto numero di soggetti

che il CoenzimaQ, attivo nei processi di produzione dell'energia intracellulare, può rallentare la progressione della malattia, risultando ben tollerato.

Ciò che i ricercatori trovano difficile a spiegarsi è il fatto che questa alterazione provoca danno solamente in alcune zone del cervello (nello striato) e non in altre. Inoltre, la teoria di proteine striato-specifiche non è stata riscontrata in nessuno studio affrontato.

Lo studio di Zuccato e Cattaneo (Zuccato e Cattaneo, 2014) è stato incentrato sulla ricerca e comprensione dell'attività dell' HTT sana tramite tecniche di ingegneria genetica.

È stato valutato il comportamento di cellule cerebrali poste in coltura dopo aggiunta di HTT umana nella forma normale, non patologica, e nella forma mutata.

Si è così notato che le cellule che sovra esprimono l' HTT sana sono resistenti a vari stimoli che portano all'apoptosi.

Sulla base di questi dati si è concluso che l' HTT è una molecola anti-apoptotica confermando, in un certo modo, l'ipotesi di un “loss of function”, riconfermata da studi americani che sottolineavano in modelli animali, come, dopo deplezione dell' HTT normale, si induceva morte neuronale di tipo apoptotico che si presentava con gli stessi sintomi della HD.

1.4 Neuropatologia

Nella HD è stata riscontrata una massiva perdita neuronale a carico della regione striatale (Halliday *et al.*, 1998; Vonsattel JPG 2008) (95% di neuroni “medium sized spyn” che proiettano al globus pallidus e alla substantia nigra) e della corteccia celebrale (Ross *et al.*, 2011) (sostanza bianca sottocorticale, talamo e ipotalamo).

Il processo neuropatologico colpisce la componente striatale e aree del SNC, spiegando così iperfagia, ipersudorazione, disturbi sessuali, e disturbi autosomici.

Si ha prima una degenerazione dei neuroni spinali medi dello striato che inibiscono l'eccitazione corticale, ottenendo quindi un'ipereccitazione corticale che poi si traduce nei disturbi motori e psichici descritti precedentemente.

È stato anche possibile evidenziare, attraverso studi anatomopatologici, una consistente perdita neuronale a carico del nucleo tuberale laterale e del nucleo paraventricolare, e parallelamente, tramite esami immunoistochimici, si è anche vista una riduzione della popolazione neuronale secernente il nonapeptide ossitocina (OX) (prodotto dall'ipotalamo e secreto dalla neuroipofisi nel circolo sanguigno), una molecola che regola le emozioni sociali, l'attaccamento della madre alla prole o tra le persone e l'empatia.

Quindi, le alterazioni del tono dell'umore, il disturbo motorio e la perdita di funzioni cerebrali importanti quali la capacità di

riconoscere le emozioni altrui, la scarsa empatia e la compromissione delle abilità cognitivo-sociali riscontrate nei malati di Corea sono tutti sintomi da ascrivere a processi apoptotici di popolazioni di neuroni secernenti specifici neurotrasmettitori, neuromodulatori, neuropeptidi e neurotrofine. La ricerca delle basi neurochimiche che sottendono le varie fasi della HD e lo studio dei legami tra queste e l'alterazione del gene della proteina HTT rappresentano uno tra i principali "targets" per la caratterizzazione e il trattamento di questa invalidante patologia neurologica. Se molteplici sono i sistemi e i circuiti neuronali alterati nei pazienti con HD, qui verranno messe in luce le possibili variazioni di due parametri neurochimici strettamente associati alla capacità di relazione sociale, al mantenimento del tono dell'umore/ansia nei limiti fisiologici oltre che alle abilità di risposta ad eventi stressanti: l'OX e la neurotrofina brain derived neurotrophic factor (BDNF).

OSSITOCINA

L'ormone neuroipofisario OX è stato il primo neuropeptide ad essere sequenziato (1984) ed anche il primo sintetizzato nella sua forma biologicamente attiva (1992). Il suo nome deriva dal greco: ὀξύς (oxus) = veloce + τόκος (tokos) = nascita, e sta, quindi, per “nascita rapida” a causa della sua attività uterotonica.

2.1 Struttura dell'ossitocina

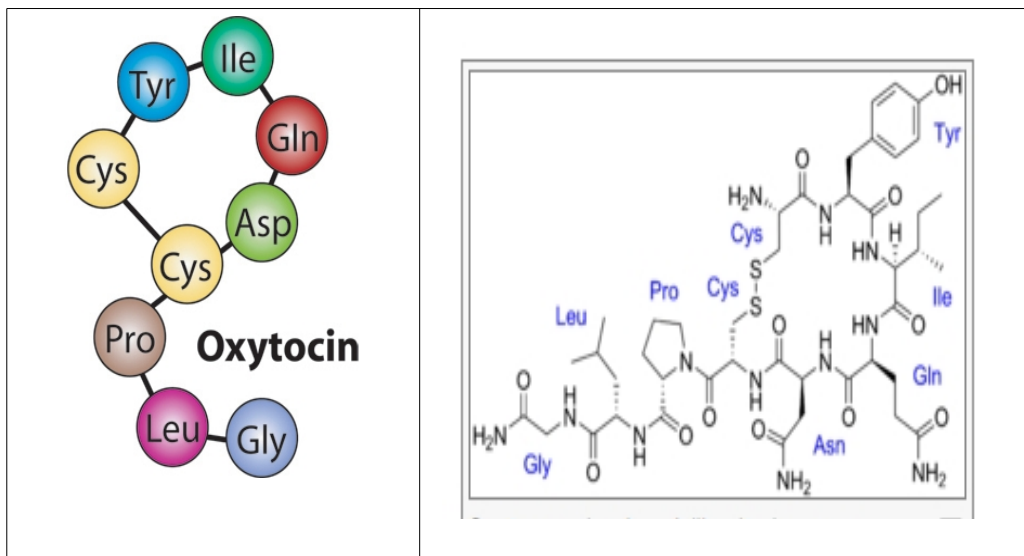


Illustrazione 3: Rappresentazione grafica e struttura amminoacidica dell'ossitocina

E' un piccolo peptide costituito da 9 amminoacidi, la cui sequenza è: cisteina, tirosina, isoleucina, glutammina, asparagina, cisteina, prolina, leucina, glicina-NH₂. E' presente un legame a ponte disolfuro tra le due cisteine in posizione 1 e 6 che conferisce alla molecola una struttura in parte ciclica (Illustrazione 3). Il suo peso molecolare è di circa 1007 daltons. La porzione carbossiterminale subisce una reazione di α -ammidazione che si realizza durante i processi di sintesi del peptide. Questa struttura è molto simile a quella di altri nonapeptidi, tra cui la vasopressina, che differisce per due soli residui aminoacidici, la fenilalanina in posizione 3 e l'arginina in posizione 8. Queste sequenze sono "affiliate" a due distinte famiglie di nonapeptidi con funzione neuroendocrina, la

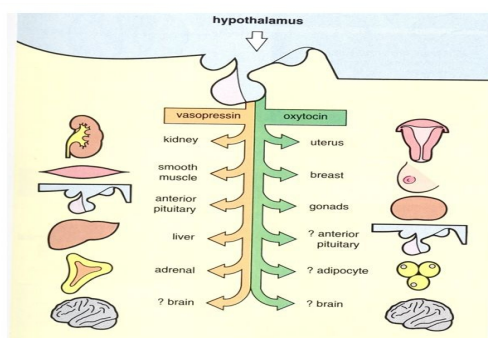


Illustrazione 4: Rappresentazione dei bersagli periferici di ossitocina e vasopressina.

famiglia dei peptidi dell'OX e quella dei peptidi della vasopressina che differiscono soprattutto per l'AA in posizione 8, un AA neutro per i peptidi della famiglia dell'OX o un AA basico (arginina o

lisina) per i peptidi della famiglia della vasopressina. In particolare, le sostituzioni degli AA in posizione 3 e 8 sono alla base delle affinità rispettive dell'OX e della vasopressina per i propri recettori (Gimpl e Fahrenholz, 2001).

Nell'illustrazione 4 sono rappresentati schematicamente i principali bersagli dell'ossitocina e della vasopressina.

2.2 Sintesi dell'ossitocina

L'OX è un peptide presente solo nei mammiferi placentari la cui sede di sintesi è principalmente l'ipotalamo (Illustrazione 5). Dall'ipotalamo, l'ormone viene poi trasportato in altre sedi del SNC e in modo particolare nella neuroipofisi.

Nell'ipotalamo l'OX viene sintetizzata da due tipi di cellule: le magnocellule e le parvocellule. Questi due tipi di cellule differiscono per dimensione e localizzazione all'interno della regione ipotalamica.

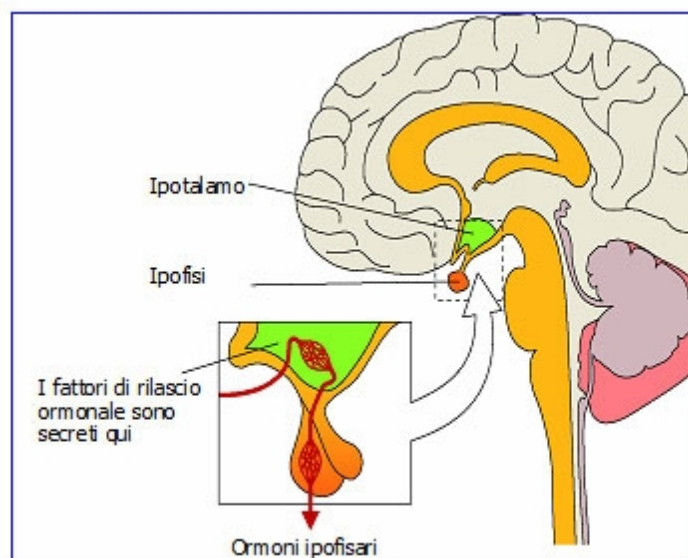


Illustrazione 5: Ipotalamo e ipofisi

Le magnocellule, più grandi, si trovano nel nucleo sopraottico e in quello paraventricolare. Il peptide prodotto viene trasportato lungo gli assoni alla neuroipofisi che funge da riserva dell'OX, la quale, dopo opportuni stimoli, viene rilasciata nella circolazione sistemica.

I neuroni parvocellulari, più piccoli, presenti nel nucleo paraventricolare dell'ipotalamo, rilasciano l'OX che andrà ad agire direttamente nel SNC.

Il rilascio da parte della neuroipofisi sembra avvenire in modo indipendente, anche se gli incrementi dei livelli di OX sia periferici che centrali sembrano coordinati.

L'OX, come altri ormoni peptidici, viene sintetizzata a partire da un precursore peptidico di dimensione maggiore, "pro-ormone", che, nel caso specifico, prende il nome di "Prerossifisina" (Illustrazione 6). Esso comprende una sequenza segnale, la sequenza dell'ormone stesso e quella della sua proteina vettore, chiamata Neurofisina I. Queste ultime due sono legate tra loro dalla sequenza "GKR", rappresentata dal tripeptide "Glicina-Lisina-Arginina".

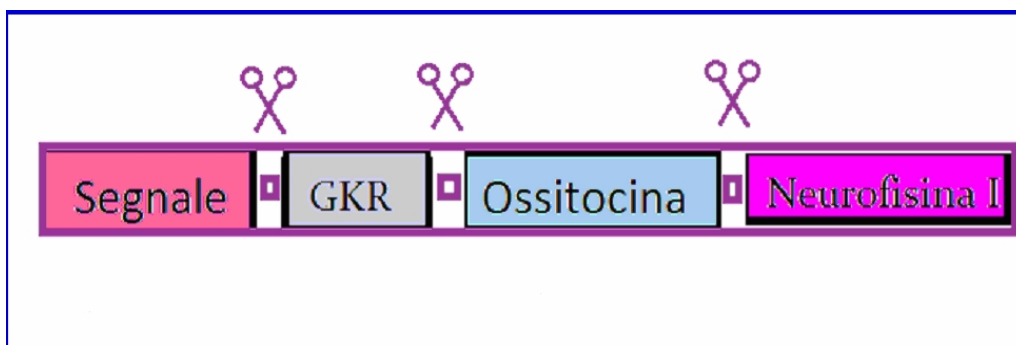


Illustrazione 6: Schematizzazione zone di taglio Prerossifisina

La Prerossifisina è stata isolata nel 1977 attraverso tecniche di isoelettrofocalizzazione e sequenziata successivamente grazie a tecniche di clonaggio molecolare e ottenimento del cDNA a partire

da lisato di ipofisi di bovino. Essa è costituita da una sequenza di oltre 100 amminoacidi avente un peso molecolare di 20 kD; nel 1992, ne fu individuato il gene responsabile della sua espressione nell'uomo, costituito da tre esoni e localizzato nel cromosoma 20. Il primo esone, in particolare, codifica per la sequenza segnale oltre che per il nonapeptide, per il tripeptide GKR e per i primi dieci amminoacidi della Neurofisina; il secondo e terzo esone codificano rispettivamente per la parte centrale e carbossi-terminale della Neurofisina. Quest'ultima, a sua volta, è costituita da circa novantacinque residui amminoacidici, tra cui si trovano molte cisteine impegnate nella formazione di ponti disolfuro. La sua funzione non è ancora ben chiara, ma si ritiene che essa sia fondamentale nel trasporto, nel ripiegamento e nell'immagazzinamento dell'ormone, prima che questo venga rilasciato.

Questa struttura, dopo essere stata sintetizzata, va incontro ad un processamento enzimatico post-traduzionale dato dalla combinazione di diverse attività consecutive a diversi livelli, che portano alla liberazione della forma biologicamente attiva dell'OX. Clamagirand C., nel 1986, scoprì che la sintesi parte da un enzima ad attività endo proteasica dibasica, il quale opera un taglio tra l'amminoacido basico Arginina della sequenza GKR ed il resto della Neurofisina, separando, così, da quest'ultima l'intermedio oxytocinil-Gly-Lys-Arg. Recentemente, l'enzima, individuato e purificato nel 1986, è stato classificato come appartenente ad una

famiglia di endoproteasi definita “pro-ormone convertasi (PC)”, tipica dei mammiferi, la quale riconosce, con alta specificità, substrati rappresentati da uno o due amminoacidi basici.

Eggel Kraut-Gottanka R. *et al.*, nel 2004, attribuirono questa attività enzimatica, più precisamente, all’isoforma PC2.

La sintesi procede con la rimozione sequenziale dei due residui Lisina e Arginina, per azione di un secondo enzima ad attività esoproteasica, specifica per coppie di amminoacidi basici terminali; da tale evento si ottiene il peptide intermedio oxytocinil-Gly. Questo secondo enzima, rappresentato da una carbossipeptidasi di tipo B, è stato isolato nel 1986, sempre a partire da lisato di neuroipofisi di bovino.

L’oxytocinil-Gly subisce l’azione di un enzima peptidil-glicina alfa-amidasi-monossigenasi (α -AE) avente attività di α -ammidazione sul residuo aggiuntivo di Glicina (numero 10 della sequenza GKR) con l’impiego di ossigeno molecolare.

Tra il 1983 e il 1993, si scoprì che l’enzima converte il precursore oxytocinil-Gly-COOH nel composto finale oxytocinil-NH₂, il quale costituisce la forma matura dell’ormone. Grazie a quest’ultimo passaggio, la molecola dell’OX è caratterizzata dalla presenza di un ammino gruppo terminale aggiuntivo, a una delle estremità; oltre a questo passaggio, all’altra estremità del peptide troviamo la struttura ciclica, generata dalla formazione del ponte disolfuro tra i due residui 1 e 6 di cisteina, all’interno della molecola. L’ ammino gruppo terminale, la struttura ciclica, insieme agli amminoacidi

cisteina, tirosina e leucina, sono fondamentali per l'attività biologica dell'ormone.

Tramite studi di cristallografia, si è osservato che dopo il taglio endoproteolitico, i precursori intermedi e il peptide maturo stesso rimangono, comunque, uniti intimamente alla Neurofisina tramite giunzioni di tipo non covalente, rappresentate da interazioni elettrostatiche e da legami idrogeno. È scaturita, inoltre, l'analogia fra tali interazioni, sia nel caso del precursore di partenza, sia dopo che questo è stato processato. Queste interazioni sono sostenute principalmente dai residui di Cisteina e Tirosina, situati, rispettivamente, in posizione 1 e 2 dell'anello.

Nel 1999 fu dimostrato sperimentalmente che questi composti intermedi possedevano una certa affinità di verso la Neurofisina.

Grazie a queste interazioni, si ha la formazione di dimeri OX-Neurofisina, i quali, tramite folding e assemblamento multimolecolare, si organizzano in aggregati macromolecolari ordinati di maggiore entità. La formazione di questo complesso avrebbe un ruolo protettivo dell'intera struttura del peptide contro un'eccessiva digestione enzimatica, prima della liberazione dell'ormone maturo.

Il rilascio, che avviene in seguito al propagarsi di un potenziale d'azione fino alla terminazione, consiste in un processo di esocitosi calcio-dipendente. Con quest'ultimo evento, si ha la liberazione nel sangue, separatamente, dell'ormone maturo e della corrispondente Neurofisina, di cui non sono note le attività biologiche

nell'organismo. Con l'esocitosi, che costituisce il passaggio del peptide dall'interno dei granuli al sangue, gli aggregati OX-Neurofisina, subiscono un cambiamento di pH da 5.5 a 7.4, che determina la rottura dei vari legami deboli. Questo passaggio induce la separazione netta tra l'OX e la Neurofisina. La concentrazione plasmatica dell'OX è estremamente bassa, sia nella donna non gravida che nell'uomo. L'ormone circola nel plasma in forma di monomero, non legato a sostanze proteiche, ha un'emivita di 5 minuti e viene catabolizzato nel fegato e nel rene, ove il peptide viene inattivato tramite un processo di acetilazione (William F. 2001).

2.3 Il gene dell'ossitocina

La struttura del gene dell'OX è stata definita inizialmente, nel ratto, nel 1984 e successivamente, anche in altre specie, tra cui l'uomo, nel 1992. In tutte le specie, tale gene è adiacente a quello del recettore della vasopressina, che dista da esso di pochi Kb, ed è espresso in direzione opposta. Questo significherebbe, secondo l'ipotesi di molti, una duplicazione a partire da un unico gene ancestrale, seguita dall'inversione di uno dei due geni.

Nell'uomo, il gene è localizzato nel cromosoma 20, nel locus p13, ed è dato da tre esoni, già ben sequenziati, di struttura molto simile a quelli individuati in altri mammiferi. Il promotore, è dato da una sequenza di circa 200 bp, e possiede una regione altamente conservata, presente oltre che nell'uomo, anche in ovini, bovini,

topi e roditori.

L'espressione di tale gene, studiata soprattutto con l'uso di topi transgenici, è soggetta ad una fine e complicata regolazione tessuto-specifica da parte di diversi elementi capaci di agire su specifiche regioni del promotore.

Sono stati individuati numerosi membri, appartenenti a importanti famiglie di recettori nucleari, capaci di interagire con tale regione e regolare, così, l'espressione del gene. Nell'uomo e nel ratto, il promotore di tale gene, a livello di specifici elementi di risposta, può essere stimolato, in una varietà di cellule, dai recettori nucleari $ER\alpha$ e $ER\beta$, specifici degli estrogeni, dal recettore $THR\alpha$ dell'ormone tiroideo e dai recettori dell'acido retinoico $RAR\alpha$ e $RAR\beta$.

Nel complesso dell'espressione di tale gene, nelle varie specie e nei diversi tessuti, si può dire che essa sia regolata da numerosi "enhancers" e "repressori", interagenti tra loro in un modo complesso che deve essere ancora ben definito.

2.4 Recettori dell'ossitocina e vie di trasduzione del segnale

L'azione dell'OX, come per altri ormoni prevede prima il legame di quest'ultima con il proprio recettore (OXR) a livello di tessuti sia centrali che periferici.

Nel ratto la presenza del recettore è stata accertata a livello di vari distretti: utero miometrio, endometrio, amnion, corion, decidua, ovaio, corpo luteo, testicoli, ghiandola prostatica, ghiandola mammaria, reni, pancreas, timo, cuore (in atri e ventricoli) e endotelio vascolare. Inoltre è stata rilevata la presenza di tale struttura, anche in alcuni tipi di cellule, come, adipociti, osteoblasti, mioblasti, e in linee cellulari di diversi tumori umani, come cancro al seno, neuroblastoma, glioma e adenocarcinoma dell'endometrio, dove sembra possa essere coinvolto nella regolazione della crescita cellulare (Guzzi F, et al 2002).

Per quanto riguarda l'uomo, purtroppo, i dati sperimentali a disposizione sono pochi: comunque recettori dell'OX sono stati individuati nelle zone della substantia nigra (suggerendo coinvolgimenti motori dovuti all'interazione con recettori a livello di neuroni dopaminergici e nigrostriatali) e del globus pallidus. Si è inoltre visto, mediante risonanza magnetica, che queste zone si attivano in soggetti adulti alla vista di una foto del proprio figlio o del partner.

Altre zone in cui sono state individuate tali strutture, sono il

cingolato anteriore e l'insula media, le quali appartengono a un'area cerebrale che recentemente è stata battezzata come il “cervello sociale” (Bartels A, Zeki S. 2000).

Il tipo recettoriale dell'OX è un recettore accoppiato a proteina G (GPCRs) di classe I, costituito da 388 AA disposti in domini transmembrana ad alfa elica uniti da 3 loop intracellulari e loop extracellulari. Il sito di legame sembra trovarsi in parte nei loop extracellulari e in parte nei domini transmembrana.

In seguito al legame tra agonista e recettore viene attivata una Fosfolipasi C (PLC) che idrolizza il fosfatidilinositolo 4,5 bifosfato formando così l'inositolo 1,4,5 trifosfato (IP_3) e l'1,2-diacylglicerolo (DAG) che sono i nostri secondi messaggeri.

- IP_3 e IP_4 (quest'ultimo generatosi da IP_3) incrementano entrambi la concentrazione di Ca^{2+} intracellulare sia liberando ioni Ca^{2+} (considerato il vero 2 messaggero) dai siti di deposito tramite canali a livello del reticolo endoplasmatico sia aprendo canali di membrana plasmatica.

-DAG attiva la proteinchinasi C, una proteina appartenente alla superfamiglia delle proteine serin-treonina chinasi, che è in grado di fosforilare e regolare l'attività di substrati proteici intracellulari a livello dei residui degli aminoacidi serina e treonina.

Generalmente il Ca^{2+} , una volta liberato all'interno del

compartimento cellulare, lega la calmodulina, proteina citoplasmatica, formando un complesso Ca^{2+} -calmodulina che attiva una proteinchinasi calmodulina dipendente.

Si è notato che il rilascio di Ca^{2+} indotto dall'OX è maggiore in presenza di Ca^{2+} extracellulare, dimostrando l'effetto su canali di membrana plasmatica da parte dell'OX e la capacità di questo agonista di promuovere un flusso di calcio tramite sistemi voltaggio dipendenti o tramite recettori canali.

2.5 Il gene del recettore dell'ossitocina

Il gene codificante per il recettore dell'OX è lungo 17kb presente in singola coppia nel genoma umano localizzato sul cromosoma 3 in posizione p25-p26.2 ed è costituito da 4 esoni e 3 introni.

La regione di inizio trascrizione si trova tra 618 e 621 paia di basi a monte della sequenza ATG, vicino a varie sequenze di legame per fattori di trascrizione. Non sono presenti elementi di risposta agli estrogeni (ERE), ma sono presenti 3 sequenze semipalindroniche appartenenti a questo motivo, che potrebbero prendere parte all'espressione del recettore in seguito a liberazione di estrogeni nelle donne prossime al parto.

2.6 Ruolo fisiologico

Per quanto riguarda i ruoli dell'OX finora individuati nei mammiferi, si può dire che questi sono numerosi (Illustrazione 7), sia a livello centrale, che periferico. Come già accennato nell'ultimo decennio, questo aspetto dell'OX e gli studi legati ad essa, hanno subito dei profondi mutamenti, poiché essa è stata individuata in aree importanti e particolari del SNC. Questo fenomeno ne ha fatto supporre anche attività neurologiche e psichiatriche, oltre a quelle ginecologiche, legate alla gravidanza, al parto e all'allattamento già note e considerate per molto tempo le sole azioni dell'OX.

E' stato anche dimostrato che in tutti i mammiferi l'OX, oltre che nel cervello, viene sintetizzata a livelli funzionalmente significativi in altri distretti dell'organismo per svolgere numerose azioni periferiche. Gerald Gimpl, nel 2001, appurò che tali zone di sintesi nei vari mammiferi, sono, generalmente, rappresentate da: utero, placenta, amnion, corpo luteo, testicoli, prostata, timo, cuore e

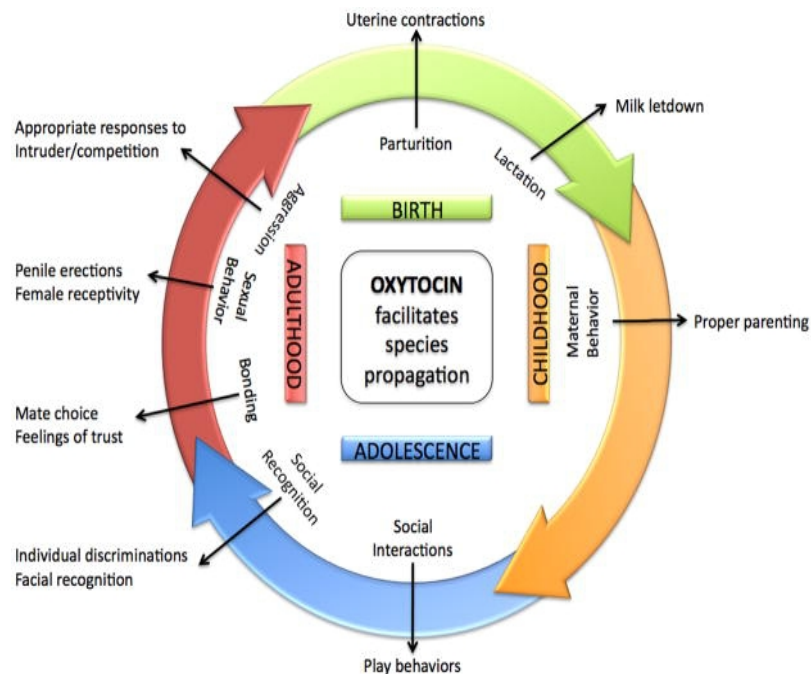


Illustrazione 7: Le possibili azioni dell'ossitocina

nell'uomo pare, anche dal pancreas (Chaves *et al.*, 2013).

Per questo motivo, si usa fare distinzione, oltre che tra funzioni centrali e periferiche dell'OX, anche fra quelle classicamente conosciute e quelle scoperte più di recente. Il SNC libera OX che va ad agire in periferia o solo nell'encefalo, mentre in periferia altre sedi possono liberare OX, a scopo "locale". Il legame tra queste vie di sintesi è tuttora in studio.

2.7 Ossitocina a livello periferico

A livello periferico, i due principali organi bersaglio dell'ormone sono le cellule muscolari lisce dell'utero e le cellule mioepiteliali della ghiandola mammaria, nel periodo della gravidanza.

Durante la gestazione, si possono rilevare l'ormone e il suo recettore, non solo nell'utero, ma anche nella placenta, nell'amniom, nel corion, e nella decidua. Con questa presenza, l'OX agisce da forte induttore del parto, determinando la contrazione delle cellule muscolari lisce dell'utero e facendo sì che il feto possa essere liberato. È interessante notare che, durante tale periodo, nei vari mammiferi non sono rilevabili grossi aumenti dei livelli plasmatici di OX, mentre nel miometrio, si può rilevare un forte incremento del numero dei recettori. Questo aumento è proporzionale al progredire della gravidanza ed è influenzato, in questa situazione, dagli estrogeni mentre, dopo il parto, il numero di recettori decade rapidamente (Adolphs R. Curr Opin 2001).

Grazie a questo ruolo dell'OX, si fa uso a livello clinico, del peptide in forma sintetica, per indurre il parto e di suoi antagonisti per impedire casi precoci.

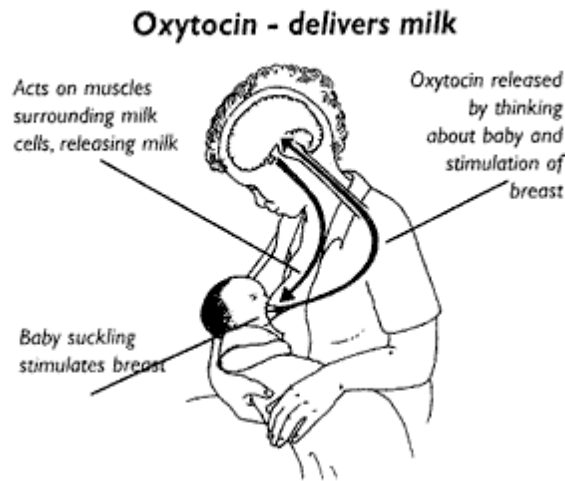


Illustrazione 8: L'ossitocina e la componente materna

L' OX ha un'azione fondamentale anche nell'allattamento (Illustrazione 8), poiché determina la contrazione delle cellule mioepiteliali delle ghiandola mammaria, inducendo la fuoriuscita del latte. Questo avviene in risposta alla suzione del capezzolo, la quale costituisce un riflesso tattile che, tramite vie nervose, raggiunge l'ipotalamo, stimolando la secrezione di OX nel plasma. Quest'ultima, infine, per mezzo dei propri recettori, determina la contrazione a livello del sito bersaglio.

Oltre a queste due azioni, considerate le più importanti, l' OX esplica la sua influenza anche in altri distretti periferici quali l'ovaio e il corpo luteo. Come fattore follicolo stimolante, è importante nel mantenimento della fertilità e stimola il rilascio e la sintesi del progesterone.

A livello cardio-vascolare, provoca effetti diversi come il rilascio

del peptide natriuretico e, nell'embrione in particolare, comporta la differenziazione dei cardiomiociti .

L'OX ha la funzione di agente natriuretico osmoregolatore renale, interviene sul Timo nella differenziazione e proliferazione cellulare. A livello del Pancreas stimola il rilascio di glucagone mentre inibisce il rilascio di insulina.

Nei Testicoli incentiva la spermatogenesi e la modulazione della steroidogenesi, oltre alla contrazione dei tubuli seminiferi e l'erezione.

Nella Prostata stimola la contrazione, eiaculazione e la crescita cellulare mentre, negli Adipociti, stimola l'ossidazione del glucosio e la citogenesi.

2.8 L'ossitocina nel SNC

Nel 2004, tramite esperimenti di autoradiografia, fu accertato il forte coinvolgimento di aree cerebrali quali nucleus accumbens, corteccia prefrontale, setto laterale, bulbo olfattivo, organo vomeronasale, amigdala, area preottica e ipotalamo, nella

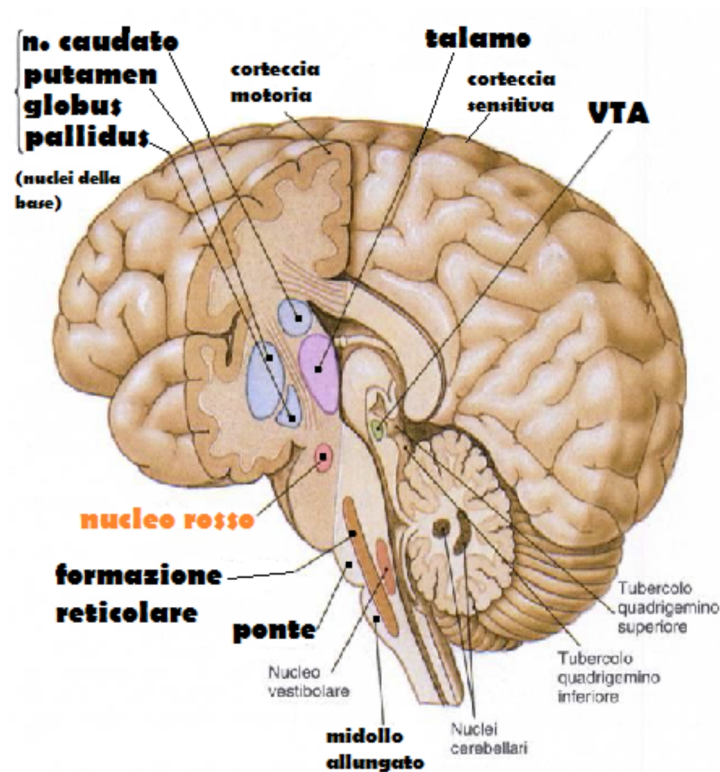


Illustrazione 9: Nuclei della base

regolazione degli scambi sociali, nel comportamento materno, nel comportamento del rapporto di coppia, nella memoria sociale (riconoscimento e la discriminazione di altri individui), nel comportamento sessuale e riproduttivo (sia per quanto riguarda il corteggiamento, che l'attività sessuale) , nei mammiferi e nei

roditori (Bielsky IF, Young LJ 2004 ; Young LJ, Wang Z. Nat 2004). Innanzitutto l'OX agisce a livello dell'ipotalamo stesso, mediante il proprio rilascio intranucleare da parte del corpo cellulare e dei dendriti appartenenti ai neuroni magnocellulari. Tale rilascio produce effetti autoregolatori sull'ipotalamo stesso, azione mediata da recettori per l'OX, presenti nella membrana dei neuroni magnocellulari. Inoltre, questo effetto stimola l'amigdala e sembra che deprima proiezioni GABAergiche, presenti in vicinanza dell'ipotalamo.

Azioni dell'OX sono state rilevate anche a livello dell'adenoipofisi, dove essa è implicata nella regolazione del rilascio della prolattina, delle gonadotropine e dell'ormone ACTH.

Numerosi effetti dell'OX sono stati rilevati anche a livello del sistema nervoso autonomo riguardo la regolazione cardiovascolare, gli effetti analgesici, le attività motorie, la termoregolazione, la motilità gastrica, l'osmoregolazione e la respirazione (Mack SO et al 2002).

L'identificazione dell'OX e del suo recettore in determinate aree cerebrali dei mammiferi, ha fatto ipotizzare che essa avesse, oltre alle azioni precedentemente descritte, anche particolari effetti centrali. La presenza dell'ormone, in relazione alla funzione svolta da tali aree, ha innescato da circa un ventennio a questa parte, profondi studi in molti mammiferi, mirati a definire questi nuovi ruoli, ben diversi rispetto alle funzioni classicamente conosciute del peptide (Kosfeld M *et al.*, 2005).

Tali studi, condotti per anni soprattutto su roditori e scimmie, hanno fornito una cospicua quantità di dati, che hanno portato a definire l'OX un ormone fondamentale per la sopravvivenza e il protrarsi di ogni specie, compreso l'uomo. Essa infatti, in base a tali ruoli, sarebbe fortemente implicata nella procreazione, oltre che da un punto di vista "pratico", anche da un punto di vista comportamentale e sociale. Ovvero, questa piccola molecola di nove amminoacidi, comporterebbe, grazie alla propria presenza in specifiche aree cerebrali, grossi effetti a livello di legami e relazioni tra individui nei mammiferi e nell'uomo come dimostrato da Eric B. Keverne, nel 2004 . Nell'uomo, l'OX avrebbe, in particolare, un ruolo chiave nella regolazione delle interazioni sociali, favorendole, permettendo la formazione e il protrarsi di relazioni forti, quali il legame madre-prole, il rapporto di coppia, e per noi umani, anche i rapporti d'amicizia. Il peptide regolerebbe non solo la formazione e la durata di tali fattori, ma anche la loro intensità e stabilità, poiché esse sarebbero fortemente implicate nella regolazione e nella formazione dell'attaccamento alla base di ogni tipo di rapporto (Storm EE, Tecott LH 2005).

LE NEUROTROFINE

La scoperta delle neurotrofine, proteine con funzione di fattore di crescita per le cellule neuronali, ha provocato cambiamenti radicali nel campo della neurofisiologia e nella concezione scientifica del trofismo del SNC e dell'encefalo in particolare, portando una luce di speranza nel buio di malattie neurodegenerative inesorabili quali la malattia di Parkinson, l'Alzheimer e la Còrea di Hungtinton.

3.1 Formazione delle neurotrofine



Illustrazione 10: Rita Levi Montalcini e i primi studi degli anni '50

Agli inizi degli anni '50, studi condotti dal premio Nobel Rita Levi Montalcini (Illustrazione 10) e collaboratori, portarono alla scoperta

che cellule maligne di topo (tipo Sarcoma 180), sintetizzano e rilasciano in circolo una molecola che svolge un ruolo essenziale nel differenziamento e nella funzionalità di due tipi di cellule nervose sensitive e simpatiche (Levi Montalcini e Hamburger, 1953 ; Cohen e Levi Montalcini, 1956; Cohen et al., 1954; Cohen et al., 1960).

Questa molecola è stata denominata fattore di crescita del nervo (NGF) ed oggi è il prototipo della famiglia proteica delle neurotrofine (NTs).

Successivamente sono stati intrapresi studi atti ad isolare altre molecole strutturalmente e funzionalmente correlate all'NGF.

Nel 1982, Barde e coautori hanno isolato dal cervello di maiale un fattore proteico, altamente omologo alla sequenza dell'NGF, denominato “brain-derived neurotrophic factor” o fattore neurotrofico derivato dal cervello (BDNF) (Barde et al., 1982 ; Leibrock J et al., 1989).

A seguire, sono state individuate altre componenti della famiglia delle NTs che, per quanto riguarda i mammiferi, comprende attualmente anche la neurotrofina 3 (NT3) e la neurotrofina 4/5 (NT-4/5) (Barde, 1990).

La famiglia delle NTs è composta da proteine secrete, strutturalmente simili , che hanno un ruolo importante nella regolazione della sopravvivenza, della differenziazione e del funzionamento di differenti popolazioni neuronali sia a livello del sistema nervoso centrale che periferico.

Per questo le NTs attualmente sono al centro di molti studi nell'ambito delle neuroscienze atti a comprendere non solo il ruolo fisiologico di queste molecole, ma anche il loro possibile coinvolgimento nella patogenesi delle malattie neurodegenerative, caratterizzate dalla morte di specifiche popolazioni neuronali (Morbo di Alzheimer, malattia di Parkinson e disturbi dell'umore come la depressione).

Le NTs sono generate come precursori pre-pro-neurotrofinici all'interno del reticolo endoplasmatico ruvido (ER), polipeptidi lunghi approssimativamente 240–260 amminoacidi, ed ulteriormente processate fino ad essere secrete come proteine omodimeriche mature nello spazio extracellulare (lunghezza del monomero: 118–129 amminoacidi per un peso molecolare di circa 12 KDa) (Halban ed Irminger, 1994; Merighi, 2002; Rothman et Orci, 1992).

Il passaggio da pro-NT a proteina matura avviene nelle cisterne della membrana del trans-Golgi (TGN) ad opera dell'enzima "FURIN" o nei granuli secretori immaturi ad opera di specifiche convertasi (Seidah et al.,1996). Possono essere generate due tipi differenti di vescicole a seconda che il meccanismo di secrezione sia costitutivo o regolato (Merighi, 2002).

I granuli secretori della via costitutiva sono piccoli (diametro delle vescicole 50–100 nm) e si fondono con la membrana plasmatica per liberare il loro contenuto in assenza di qualsiasi specifico meccanismo d'attivazione (Halban e Irminger, 1994; Hokfelt *et al.*,

2000; Harter e Reinhard, 2000). Questa via costitutiva è presente in tutti i tipi di cellule ed è indipendente dai livelli intracellulari di Ca^{2+} .

A queste si contrappongono le vescicole, relativamente grandi (diametro 100–300 nm), che fanno parte della via regolata della secrezione proteica: contrariamente ai granuli costitutivamente secreti, le vescicole della via regolata si fondono con la membrana plasmatica a seguito di un aumento della concentrazione intracellulare di Ca^{2+} (Lang *et al.*, 2001).

Per studiare i meccanismi della secrezione regolata neuronale del BDNF sono stati fatti diversi studi su neuroni ippocampali. In questi esperimenti è stato valutato l'aumento del contenuto di BDNF nel sovranatante di colture cellulari tramite test ELISA: è risultato che la depolarizzazione indotta da glutammato o da K^+ 50mM (Canossa *et al.*, 1997; Griesbeck *et al.*, 1999) determina un notevole aumento della concentrazione intracellulare di Ca^{2+} che causa il rilascio del BDNF dalle vescicole secretorie.

Altri esperimenti effettuati su neuroni del sistema nervoso



Illustrazione 11: Struttura proteica del BDNF

periferico in coltura (Balkowiec e Katz, 2000) hanno riportato che una scarica di stimoli elettrici extracellulari (50 pulses di 20-50 Hz ad intervalli di 20 sec per 30/60 min) provoca un accumulo di BDNF nello spazio extracellulare, mentre un pattern di stimolazione con una frequenza più bassa è inefficace. Questi dati suggeriscono che la secrezione del BDNF è dipendente dalle alte concentrazioni intracellulari di Ca^{2+} che possono essere raggiunte con influsso di Ca^{2+} a seguito di stimoli elettrici ad alta frequenza.

3.2 I recettori delle neurotrofine

Le neurotrofine legano due differenti tipi di recettore:

- 1) i recettori Trks (chinasi tropomiosina-connessa) appartenenti alla famiglia di recettori tirosin-chinasici
- 2) il recettore p75, un membro della superfamiglia dei recettori per il fattore di necrosi tumorale (TNF).

Ogni NT lega uno specifico recettore Trk (Illustrazione 12); in particolare NGF attiva TrkA, mentre il BDNF e NT-4/5 attivano TrkB e NT-3 attiva TrkC (Kaplan e Miller, 2000); per quanto riguarda p75 studi in vitro hanno dimostrato come questo recettore leghi preferenzialmente la forma immatura delle NTs (Lee et al., 2001).

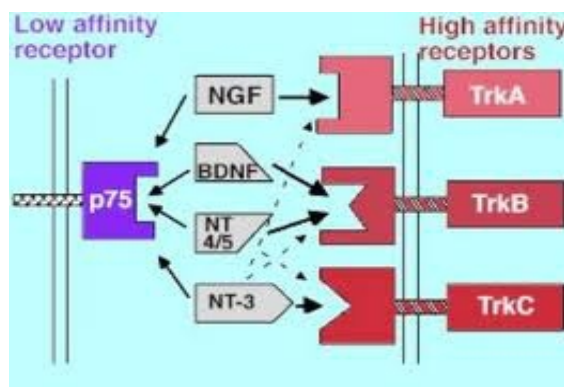


Illustrazione 12: Le neurotrofine e i loro recettori

Il legame della NT al recettore Trk provoca la dimerizzazione del

recettore e innesca l'attività tirosin-chinasica.

Ci sono 10 residui di tirosina conservati nel dominio citoplasmatico di ogni recettore Trk, tre dei quali presenti nel loop di autoregolazione del dominio chinasi. La fosforilazione di questi amminoacidi attiva ulteriormente la chinasi, mentre, la fosforilazione degli altri residui, promuove il segnale creando siti di legame per gli adattatori proteici che accoppiano questi recettori alle cascate di trasduzione del segnale intracellulari, compresa la via Ras/ERK (extracellular signal regulated kinase), la via PI3K/Akt (Phosphatidylinositol-3-OH kinase) e la PLC- γ 1 (phospholipase C) (Kaplan e Miller, 2000; Pawson e Nash, 2000).

Queste vie di segnalazione culminano nell'attivazione di alcuni fattori di trascrizione che alterano il pattern di espressione genica.

In condizioni fisiologiche il legame delle NTs mature ai recettori Trks e p75 promuove la sopravvivenza cellulare, poiché il segnale di sopravvivenza mediato da Trk sopprime il segnale pro-apoptotico proveniente da p75 ed agisce sinergicamente col segnale anti-apoptotico proveniente da p75 (Dobrowsky *et al.*, 1995; Yoon *et al.*, 1998; Mazzoni *et al.*, 1999; Aloyz *et al.*, 1998; Maggirwar *et al.*, 1998; Hamanoue *et al.*, 1999).

Negli stati patologici invece predomina il segnale pro-apoptotico proveniente da p75 (alterazione dell'equilibrio pro/anti-apoptotico).

3.3 Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF)- Ruolo fisiologico

All'interno della famiglia delle NTs, il BDNF si distingue quale potente fattore fisiologico di sopravvivenza: si ritiene infatti che abbia un ruolo importante nella sopravvivenza, differenziazione e crescita di neuroni centrali e periferici durante lo sviluppo e in età adulta. Di fatto, il BDNF costituisce il fattore trofico maggiormente diffuso nel cervello e partecipa ai meccanismi di plasticità come il potenziamento a lungo termine, l'apprendimento e la memoria (Schinder et al., 2000).

Era già noto che il differenziamento e la sopravvivenza dei neuroni striatali fosse regolato dal BDNF.

Nonostante ciò la sua produzione (nel SNC) non è attribuibile ai neuroni striatali. Il BDNF infatti è prodotto a livello della corteccia e poi trasportato per via retrograda dal corpo cellulare, lungo le fibre corticali che si connettono allo striato dove viene poi rilasciata la NT.

In base a queste evidenze si è pensato che la morte neuronale possa essere correlata a un malfunzionamento del trasporto del BDNF allo striato.

Il BDNF produce inoltre effetti molto più acuti sulla plasticità sinaptica e sul rilascio neurotrasmettitoriale e agevola il rilascio di glutammato, acido γ -aminobutirico (GABA), dopamina e

serotonina (Goggi *et al.*, 2002; Schinder *et al.*, 2000).

Il trascritto (RNA messaggero) del BDNF non è sintetizzato solamente a livello neuronale ma anche in molti altri tessuti ed organi periferici quali pareti aortiche, endotelio, cuore, reni, ghiandole sottomascellari, ovaie, gangli dorsali, muscoli e polmoni (prove sperimentali nei topi) (Fujimura *et al.*, 2002). Anche nel sangue è stata osservata la presenza del BDNF anche in linfociti e piastrine (Yamamoto *et al.*, 1990), ma la sua presenza non è stata ancora confermata. Il BDNF viene rilasciato in tali sedi dalle cellule bersaglio agendo come fattore di sopravvivenza per queste.

Rosenfeld e colleghi hanno rilevato la presenza del BDNF anche a livello ematico (Rosenfeld *et al.*, 1995). I livelli di BDNF sono circa 10 volte superiori nel siero rispetto al plasma, forse perché le piastrine rilasciano elevate quantità di BDNF quando sono attivate. Di fatto, le piastrine non sono capaci di produrre il BDNF ma lo catturano dal plasma attraverso un meccanismo non ancora noto (Fujimura *et al.*, 2002). Il BDNF plasmatico è verosimilmente prodotto dall'endotelio, dalla muscolatura liscia e dai macrofagi e linfociti attivati. Gli autori hanno opinioni divergenti in merito al superamento della barriera emato-encefalica da parte del BDNF (Pan *et al.*, 1998) quindi non è chiaro se i neuroni centrali e gliali influenzino di fatto la concentrazione ematica del BDNF.

Inoltre, il ruolo del BDNF a livello piastrinico non è ancora noto: probabilmente ha una funzione specifica nei processi infiammatori,

nei traumi tissutali, lesioni nervose ed emorragie. Infatti, quando le piastrine attivate rilasciano il BDNF, quest'ultimo avrebbe probabilmente un ruolo nell'infiammazione e nella proliferazione cellulare e un'azione sulla muscolatura liscia.

I livelli di BDNF possono variare in risposta a vari tipi di stimoli come stress, somministrazione di farmaci, ma variano anche autonomamente durante l'arco della giornata.

3.4 Sintesi e secrezione del BDNF

La proteina BDNF è sintetizzata come pre-pro-BDNF. Il pre-

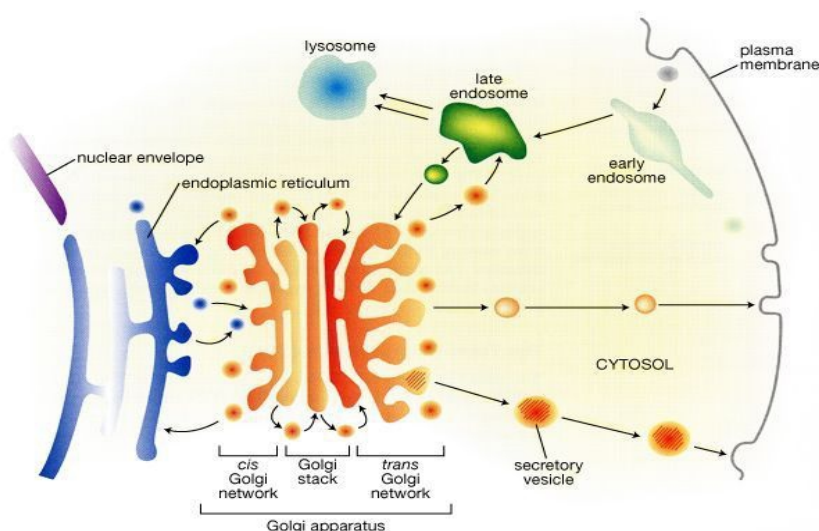


Illustrazione 13: Organizzazione cellulare

dominio di 18 aminoacidi è immediatamente tagliato dopo la traslocazione della proteina nascente nel reticolo endoplasmatico (Illustrazione 13). Il *pro*-BDNF (32Kda) viene trasportato dapprima alle cisterne *cis* dell'apparato del Golgi e successivamente al *trans*

Golgi tramite un trasporto mediato da vescicole. Dal *trans*-Golgi si diramano due vie di secrezione del BDNF, una costitutiva ed una regolata. Per la secrezione costitutiva, il BDNF subisce un taglio proteolitico del predominio da parte di proteine specifiche del *trans*-Golgi. La forma matura (14Kda) viene internalizzata in vescicole e trasportate verso la membrana plasmatica per la secrezione.

Il BDNF secreto interagisce coi recettori Trk-B pre e post-sinaptici per innescare le diverse vie di trasduzione dei segnali intracellulari. Per la secrezione regolata, il pro-BDNF viene internalizzato in granuli, che dal *trans*-Golgi trasportano la forma non matura della NT verso le membrane plasmatiche. Durante il trasporto enzimi proteolitici effettuano il taglio che consente la conversione del pro-BDNF in BDNF maturo. I granuli contenenti la forma matura della NT si accumulano a livello delle membrane e la secrezione del BDNF avviene solo in seguito a stimoli specifici (Lessmann *et al.*, 2003).

Il proBDNF di 32 Kda oltre a dare origine alla forma matura della NT, può svolgere una funzione extracellulare nei terminali sinaptici, promuovendo la morte cellulare per apoptosi (Teng *et al.*, 2005).

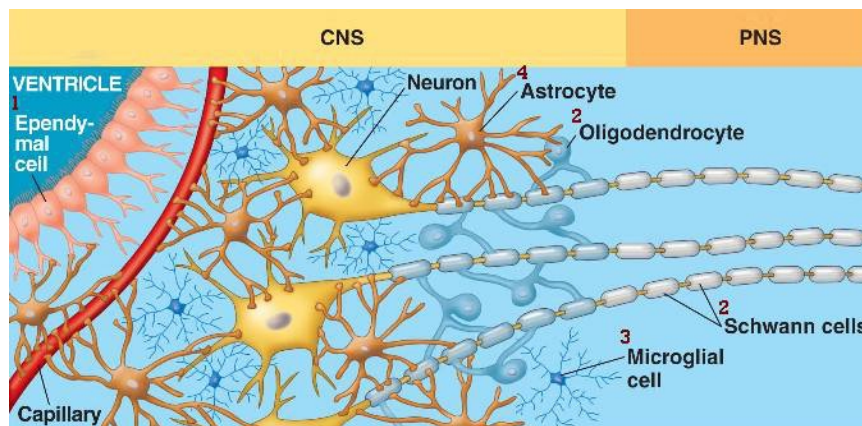


Illustrazione 14: Rappresentazione struttura neuronale

Il BDNF è presente soprattutto nei neuroni (Murer *et al.*, 2001), ma alcuni lavori hanno evidenziato anche la capacità delle cellule gliali (Illustrazione 14) di esprimere il BDNF in condizioni di stress metabolico (Ceccatelli *et al.*, 1991; Batchelor *et al.*, 1999). Furukawa e colleghi (1998) hanno riportato la presenza di oligodendrociti BDNF-immunoreattivi nella sostanza bianca del cervello di ratto e studi successivi hanno dimostrato la capacità della microglia di secernere ridotte quantità di BDNF in vitro. Sebbene questi dati riportino evidenze della capacità delle cellule gliali di produrre BDNF, l'ipotesi più accreditata è che la NT presente in tali cellule venga internalizzata dall'ambiente esterno, come suggerito dalla presenza sulla membrana plasmatica della forma tronca del recettore TrkB, capace di legare il BDNF e di promuoverne l'internalizzazione, ma non in grado di tradurre il segnale perché privo di dominio catalitico (Frisen *et al.*, 1993; Rudge *et al.*, 1994; Roback *et al.*, 1995; Nakajima *et al.*, 1998).

Il BDNF è ampiamente distribuito nel SNC, con livelli più elevati

nella corteccia cerebrale, nello striato, nel proencefalo, nell'ippocampo, nell'ipotalamo, nel tronco encefalico e nel cervelletto (Murer *et al.*, 2001). L'espressione del messaggero del BDNF e della proteina sono sostanzialmente simili nella maggior parte delle regioni cerebrali.

Alcuni studi però hanno rivelato nello striato la presenza della proteina e la mancanza del messaggero (Altar *et al.*, 1997; Baquet *et al.*, 2004).

Poiché i neuroni corticali che innervano lo striato contengono elevate quantità di messaggero del BDNF, è stato ipotizzato che la maggior parte della NT nello striato abbia origine dalla corteccia (strati II-III e IV-V) e venisse trasportata per via anterograda allo striato (Dugich-Djordjevic *et al.*, 1995; Altar *et al.*, 1997; Fusco *et al.*, 2003; Baquet *et al.*, 2004).

3.5 Il gene del BDNF umano

Il gene del BDNF umano, come descritto dal gruppo di ricerca diretto da Tonis Timmusk del Department of Gene Technology, Tallinn University of Technology, Estonia, si estende per circa 70 Kb ed è costituito complessivamente da 11 esoni e 9 promotori funzionali (Pruunsild *et al.*, 2007), responsabili della formazione di diversi trascritti tessuto-specifici, accomunati dalla regione 3' codificante per la proteina (l'esone IXd) e distinguibili per le sequenze UTR (untranslated region) in 5' (Illustrazione 15).

Nell'esone IX ritroviamo la sequenza destinata ad essere tradotta

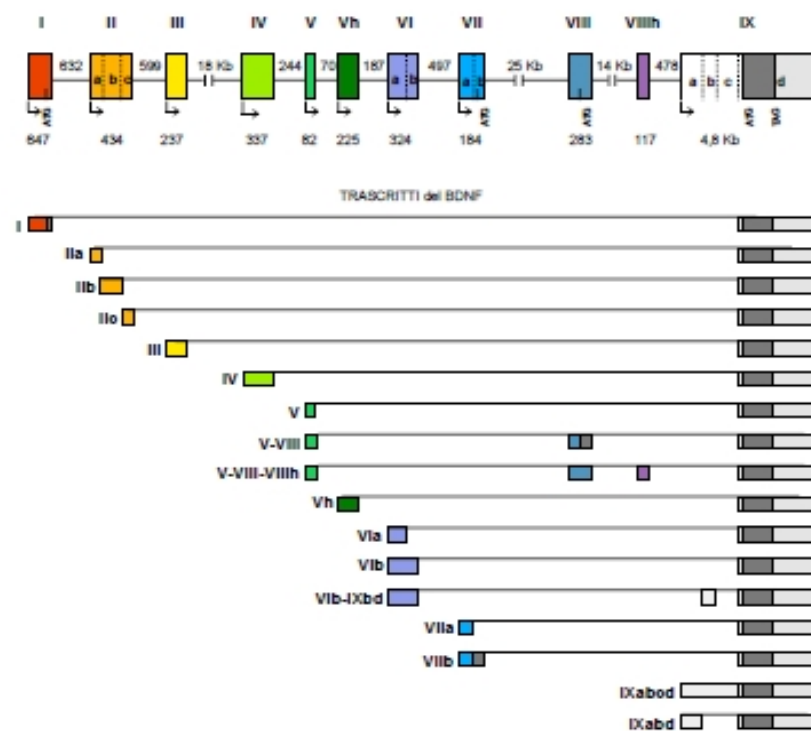


Illustrazione 15: Possibili punti di inizio trascrizione per la sintesi del BDNF

nella proteina BDNF, delimitata dalla tripletta d'inizio traduzione ATG e dal codone di stop TAG. Tale esone è suddiviso in 4 regioni (a, b, c, d). Generalmente durante il processo di trascrizione l'esone IX viene coniugato con un altro esone a monte (I-VIIIh) e in questi casi i trascritti maturi si trovano ad includere solamente la porzione più a valle dell'esone IX, ovvero la regione IXd.

Gli esoni I, VII e VIII presentano dei codoni ATG interni che possono essere utilizzati come sito d'inizio traduzione, portando conseguentemente alla formazione di una proteina prepro-BDNF con un N-terminale più lungo.

Negli esoni II, V e VI sono presenti diversi siti di splicing che determinano la formazione di trascritti accomunati dalla regione codificante che differiscono tra loro per la lunghezza delle 5'UTR.

I trascritti alternativi del BDNF hanno un'espressione tessuto-specifica.

E' stato dimostrato che gli RNA messaggeri contenenti gli esoni II, III, IV, V e VII sono prevalentemente rilevabili a livello cerebrale, mentre gli altri trascritti, sono espressi nei tessuti periferici (Pruunsild *et al.*, 2007).

Un numero così elevato di esoni, la presenza di più siti d'inizio trascrizione, di promotori e di diversi siti di splicing lasciano presupporre una complessa attività regolatrice dell'espressione di questo gene. Numerosi studi sono quindi stati condotti per identificare le possibili sequenze implicate nella regolazione dell'espressione del BDNF.

E' stata poi osservata la presenza di trascritti definiti antiBDNF, ovvero, RNA antisenso non codificanti, trascritti a partire dal gene del BDNF umano, capaci di formare col trascritto senso del BDNF un RNA a doppio filamento non traducibile in proteina (Pruunsild *et al.*, 2007).

3.6 Trasporto anterogrado e retrogrado del BDNF

Il trasporto intracellulare di proteine e organelli è fondamentale per la sopravvivenza delle cellule ma, dal momento che i neuroni sono cellule estremamente polarizzate, nel sistema nervoso tale processo assume caratteristiche peculiari. I neuroni infatti hanno un corpo cellulare che si prolunga con assoni e dendriti, e spesso tali strutture proiettano a considerevole distanza l'uno dagli altri (nell'uomo, l'assone di un motoneurone può superare anche la lunghezza di 1 m).

Il trasporto assonale può essere distinto a seconda della direzione in anterogrado o retrogrado.

I motori molecolari sono chinesina e dineina, o ATPasi microtubuli-associate, capaci di utilizzare l'energia fornita dall'idrolisi dell'ATP per muovere il carico lungo i microtubuli stessi.

Il trasporto in senso anterogrado, cioè dal corpo cellulare verso le terminazioni assoniche, viene utilizzato per il trasporto di tutti i componenti membranosi di nuova sintesi che devono raggiungere le terminazioni nervose; il trasporto retrogrado, in direzione opposta, e invece finalizzato al riciclo degli stessi.

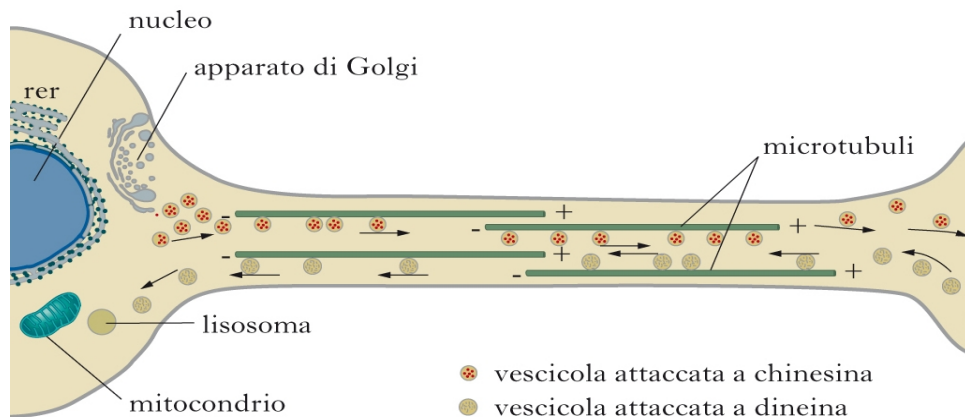


Illustrazione 16: Schematizzazione struttura nervosa e trasporto assonale

La presenza di BDNF nei neuroni striatali è il risultato di un trasporto anterogrado che consente lo spostamento della neurotrofina dalla corteccia e, in modo minore, dalla *pars compacta* della *substantia nigra*, allo striato (Illustrazione 16). Il fenomeno del trasporto anterogrado del BDNF dalla corteccia allo striato è stato ampiamente dimostrato. Nei roditori, in seguito ad iniezione intracerebroventricolare con colchicina, un farmaco che ostacola l'assemblamento dei microtubuli, si è osservata una netta riduzione del contenuto striatale di BDNF e un parallelo aumento dell'immunoreattività per tale neurotrofina nei corpi cellulari dei neuroni della corteccia e della *substantia nigra* (Altar *et al.*, 1997). Inoltre, la rimozione unilaterale della corteccia frontale e parietale nei roditori ha determinato una diminuzione della immunoreattività per il BDNF nello striato (Altar *et al.*, 1997).

Per escludere un eventuale contributo dei neuroni dello striato nella

produzione di BDNF è stata operata, dallo stesso gruppo di ricercatori, un'iniezione intrastriatale con acido chinolinico. Questa tossina è in grado di distruggere in maniera selettiva i neuroni striatali risparmiando le terminazioni assoniche afferenti dalla corteccia e dalla substantia nigra. In questa situazione non si è osservata nello striato alcuna diminuzione dell'immunoreattività per il BDNF, a conferma dell'assenza di contributo dei neuroni striatali alla produzione di BDNF (Altar *et al.*, 1997).

Questi studi sono stati però criticati in quanto l'ablazione della corteccia non blocca solo l'apporto di BDNF, ma danneggia in generale tutta la neurotrasmissione del circuito cortico-striatale.

Per questo motivo e per confermare l'esistenza del trasporto anterogrado del BDNF lungo la via cortico-striatale, il gene del BDNF è stato inattivato nella corteccia cerebrale di topo (Baquet *et al.*, 2004). In questi modelli animali si è osservata la completa perdita di BDNF nello striato e un decremento del volume corticale e striatale. L'analisi morfologica dei neuroni striatali ha rivelato una riduzione significativa del soma, un assottigliamento dei dendriti e una diminuzione della densità delle spine dendritiche. Non è stato invece osservato un effetto massiccio di morte cellulare (Baquet *et al.*, 2004). Questi risultati evidenziano che il BDNF ha un ruolo fondamentale nella promozione del differenziamento e nel mantenimento di un fenotipo maturo dei neuroni striatali.

Il BDNF oltre ad essere trasportato per via anterograda lungo le afferenze cortico-striatali, può subire anche un trasporto retrogrado

(Altar *et al.*, 1998) dai processi cellulari al soma mediante l'interazione con i recettori TrkB presenti sui terminali pre-sinaptici (Heerssen *et al.*, 2004). Tale interazione induce una risposta nucleare fondamentale per promuovere la sopravvivenza cellulare e per consentire il recupero da danni cellulari indotti da stimoli tossici (Lindholm *et al.*, 1994; Heerssen *et al.*, 2004).

STATO DELL'ARTE

4.1 Ossitocina e Cognizione Sociale nella malattia di Huntington

L'OX ha una lunga storia nella regolazione del comportamento sociale (Insel *et al.*, 2000) : dal punto di vista evolutivo sono state identificate sostanze con funzioni simili anche in invertebrati e vertebrati.

Numerosi studi sui mammiferi nell'ultimo decennio hanno permesso di intuire la relazione dell'OX con il SNC e gli effetti psichiatrici e comportamentali che ne conseguono.

L'OX, ha un importante ruolo nella regolazione del comportamento sociale nei mammiferi; è interessante come il rilascio di questo peptide determini “sfumature” comportamentali genere-dipendenti: in particolar modo, nel genere femminile assume un ruolo predominante essendo alla base del senso di protezione della prole e stimolando la formazione di forti legami sociali.

Nei mammiferi, il diverso atteggiamento sociale tra generi riflette differenze nelle strategie riproduttive. Nel genere maschile è alta la competitività con esponenti dello stesso sesso e il successo è rappresentato dalla capacità di accoppiarsi con il maggior numero possibile di esponenti dell'altro sesso; essi tendono raramente a formare forti legami.

Al contrario il genere femminile investe nei rapporti al fine di generare prole interessandosi alla cura di questa, propendendo quindi per la formazione di forti legami.

Queste differenze tra i due sessi trovano un correlato nella diversa espressione di OX, infatti in corso di gravidanza, gli ormoni femminili stimolano la sintesi di OX e l'espressione di specifici recettori a livello del bulbo olfattivo, area preottica mediale, amigdala mediale e nucleo accumbens, importante stazione del circuito di "reward" dove estrogeni e progesterone stimolano anche recettori dopaminergici (Keverne *et al.*, 2004)

Nei roditori di piccola taglia la somministrazione intraventricolare di OX ha comportato un aumento della tendenza all'affiliazione sociale e una riduzione di ansia ed aggressività (Harmon *et al.*, 2002).

Il rapporto tra OX e cognizione sociale è ulteriormente supportato dalla compromissione del riconoscimento sociale, associato all'integrità dell'apprendimento e della memoria, in topi knockout per OX (Kavaliers *et al.*, 2003), deficit compensato dalla somministrazione di OX in particolare a livello dell'amigdala (Ferguson JN *et al.* 2001).

Diversi studi in letteratura hanno messo in relazione cambiamenti dei livelli plasmatici di OX con comportamenti affettivi alterati nel contesto di patologie neuropsichiatriche (Modahl *et al.*, 1998; Goldman *et al.*, 2008) o con lo stato d'ansia in volontari sani

(Marazziti *et al.*, 2006); infine livelli elevati di OX sono stati rilevati all'autopsia in pazienti affetti da malattia di Alzheimer.

Sulla base dei suddetti risultati, è stato condotto uno studio su 36 pazienti trattati con placebo (n:18) o con OX intranasale ad un dosaggio di 20UI (n:18) dal quale è emerso che la somministrazione di OX migliora il riconoscimento dell'espressione dei volti, in particolare, nel caso in cui esprimano rabbia (Savaskan *et al.*, 2008).

I primi dati in letteratura riguardanti la percezione delle espressioni dei volti nella HD risalgono al 1996 quando Sprengelmeyer dimostrò, mediante il test di Benton per il riconoscimento dei volti, una compromissione del riconoscimento di volti che esprimevano disgusto già nelle fasi iniziali di malattia (Sprengelmeyer *et al.*, 1996); dato confermato anche in pazienti presintomatici (Gray *et al.*, 1997) anche per stimoli di tipo uditivo, olfattivo o gustativo (Hayes *et al.*, 2007). Parallelamente studi successivi hanno dimostrato un'estesa compromissione del riconoscimento di emozioni negative senza però evidenziare un prevalente deficit nel riconoscimento del disgusto (Henley *et al.*, 2008; Johnson *et al.*, 2007). Benchè molti studi differiscano per tipo di stimolo utilizzato e grado di malattia indagato, per quanto riguarda il riconoscimento delle espressioni del volto, una recente revisione ha dimostrato una maggior compromissione del riconoscimento della rabbia e disgusto in pazienti con HD manifesta e un deficit prevalente nel riconoscimento del disgusto in pazienti pre-sintomatici (Henley *et*

al., 2012).

Questi presupposti clinici insieme ai danni riscontrati sulla vitalità dei neuroni secernenti OX sembrano a favore di un ruolo del neuropeptide nello sviluppo del complesso quadro clinico dei pazienti con Còrea.

4.2 Il BDNF nella Malattia di Huntington

Esperimenti in modelli *in vitro* e *in vivo* della HD condotti e pubblicati nel 2001, hanno mostrato come l'HTT sana, ma non quella mutata, promuova la produzione di BDNF agendo a livello trascrizionale (Zuccato *et al.*, 2001).

La capacità dell'HTT di stimolare la produzione di BDNF è stata inizialmente dimostrata *in vitro* in modelli cellulari Huntington. In cellule ST14A, di derivazione neurale ed ingegnerizzate per sovraesprimere l'HTT umana normale, si è evidenziato un incremento della produzione di BDNF rispetto ai controlli. I livelli di proteina BDNF sono invece significativamente ridotti in cellule che sovraesprimono la proteina HTT mutata (Zuccato *et al.*, 2001). Un secondo gruppo di esperimenti ha mostrato come l'incremento della produzione di BDNF in cellule esprimenti HTT normale sia dovuto ad una promozione della trascrizione a livello del promotore II del gene e come questo effetto si perda in presenza della mutazione (Zuccato *et al.*, 2001). Risultati simili sono stati ottenuti *in vivo*, in tessuti cerebrali di topi sovraesprimenti l'HTT umana normale e mutata (Zuccato *et al.*, 2001).

Negli anni successivi numerosi studi hanno confermato la presenza di ridotti livelli di BDNF in diversi modelli animali della HD:

- topi BAC esprimente l'HTT umana intera con 103 glutammine, mostrano una riduzione significativa della trascrizione del BDNF in corteccia accompagnata dalla comparsa dei sintomi motori (Gray *et al.*, 2008);
- topi R6/2, esprimenti un frammento N-terminale dell'HTT mutata di 1,9 Kb contenente 160 glutammine, mostrano una diminuzione nel cervello del trascritto e della proteina BDNF a partire da stadi pre-sintomatici (Zuccato *et al.*, 2005; Apostol *et al.*, 2008);
- topi knock-in eterozigoti ed omozigoti per l'HTT mutata esprimono ridotti livelli di RNA messaggero e proteina BDNF nel cervello (Simmons *et al.*, 2009; Zuccato *et al.*, 2007).

Il rilevamento della riduzione dei livelli di BDNF nei modelli animali di malattia di Huntington ha portato ad ipotizzare la presenza di una disfunzione simile anche nell'uomo.

A dispetto delle difficoltà che si incontrano nell'analisi di campioni autoptici di origine umana, diversi studi sono stati condotti per rilevare i livelli di BDNF nel cervello umano. Il primo studio risale al 2000 quando il Dott. Ferrer dell'Unità di Neuropatologia di Barcellona in Spagna, analizzando un esiguo numero di campioni (4 pazienti Huntington e 6 controlli) osservò una riduzione dei livelli della proteina BDNF nello striato ma non nella corteccia (Ferrer *et*

al., 2000). Un lavoro del 2004 ha confermato questi dati su tessuti autoptici prelevati da 10 pazienti e 7 controlli (Gauthier *et al.*, 2004). Un terzo studio ha utilizzato la collezione di tessuti più ampia ad oggi analizzata, evidenziando una riduzione dei livelli di questa NT anche in corteccia (Zuccato *et al.*, 2008). La riduzione del BDNF compare dai primi stadi della patologia. In questo studio sono stati valutati anche i livelli di RNA messaggero del BDNF , significativamente ridotti nei tessuti autoptici di pazienti Huntington rispetto ai tessuti ottenuti da soggetti controllo (Zuccato *et al.*, 2008).

I diversi risultati ottenuti in questi studi potrebbero essere riconducibili alle diverse metodiche analitiche utilizzate e alla diversità dei campioni analizzati. Studi condotti su modelli animali della malattia di Huntington e in controlli hanno mostrato che l'HTT sana, ma non quella mutata, è in grado di stimolare la trascrizione del BDNF agendo a livello del promotore II del gene. L'HTT mutata, riduce invece la trascrizione del BDNF bloccando principalmente l'attività del promotore II, ma anche quella dei promotori III e IV.

La regolazione dell'espressione del trascritto II del BDNF dipende principalmente dall'attività di una sequenza silenziante chiamata NRSE/RE1 (Neuron-Restrictive Silencer Element/Repressor Element1) situata a monte dell'esone II. Il *neuron-restrictive silencer factor* (NRSF), chiamato anche *repressor element silencing transcription factor* (REST), è il fattore trascrizionale capace di legare

la sequenza RE1/NRSE e di attivare la sua capacità silenziante. Nel 2003, è stato dimostrato che l'HTT sana è capace di trattenere il fattore REST nel citoplasma evitandone la traslocazione nel nucleo e promuovendo la trascrizione del gene codificante per la neurotrofina BDNF (Zuccato *et al.*, 2003). L'HTT mutata, presentando una ridotta capacità di legare il fattore REST, permette il suo ingresso all'interno del nucleo e il suo legame alla sequenza NRSE presente a monte dell'esone II, bloccando così la trascrizione del BDNF (Zuccato *et al.*, 2003; Zuccato *et al.*, 2007). La sequenza NRSE/RE1 è stata trovata in numerosi geni fondamentali per il mantenimento e per il differenziamento neuronale. Uno studio condotto dal gruppo di ricerca del Prof. Noel Buckley della School of Biochemistry and Microbiology and Biomedical Sciences, University of Leeds, United Kingdom ha evidenziato la presenza di più di 1300 siti NRSE/RE1 nel genoma murino e umano, la maggior parte dei quali codifica per canali ionici, neurotrasmettitori, fattori di crescita, ormoni, fattori coinvolti nel traffico vescicolare e molecole preposte al mantenimento del citoscheletro e della matrice cellulare (Bruce *et al.*, 2004; Johnson *et al.*, 2008). Studi successivi hanno dimostrato che nella HD si osserva una riduzione della trascrizione genica oltre che del BDNF anche di altri geni espressi nei neuroni sotto il controllo di RE1/NRSE (Zuccato *et al.*, 2007).

Oltre alla riduzione della trascrizione del gene del BDNF a livello centrale, nella Còrea si sono riscontrate anche alterazioni del

trasporto vescicolare della proteina.

L'HTT normale, oltre a promuovere la trascrizione del gene del BDNF è infatti anche in grado di promuovere il trasporto vescicolare della NT.

Studi condotti da ricercatori del gruppo di Frederic Saudou dell'Unité Mixte de Recherche, Centre National de la Recherche Scientifique, Institut Curie, Irsay Cedex, in Francia, pubblicati nel 2004, hanno evidenziato la capacità dell'HTT sana di promuovere il trasporto vescicolare del BDNF lungo i microtubuli. Questo studio mostra che l'HTT sana interagisce con una proteina coinvolta nel trasporto assonale chiamata HAP1 (*huntingtin associated protein*) che può reclutare alternativamente la subunità p150Glued della dinactina o le catene leggere della chinesina guidando così il trasporto retrogrado e/o anterogrado lungo i neuroni (Gauthier *et al.*, 2004). L'interazione dell'HTT mutata con HAP1 invece riduce la capacità di quest'ultimo di associarsi alla subunità p150Glued della dinactina, compromettendo in tal modo l'interazione con la chinesina (Gauthier *et al.*, 2004). In questo modo, il trasporto retrogrado ed anterogrado di vescicole contenenti BDNF viene a trovarsi ridotto. Uno studio recente condotto da Lu Shiun Her e Lawrence S.B. Goldstein del Department of Cellular and Molecular Medicine, University of California, San Diego, USA, ha riscontrato riduzione del trasporto vescicolare del BDNF nei neuroni primari striatali e ippocampali da modelli murini knock-in della HD. Non si osservano invece alterazioni del trasporto in neuroni corticali (Her

& Glodestein, 2008). Contrariamente alle scoperte del gruppo di Saudou (Gauthier *et al.*, 2004), questo studio ha mostrato che i difetti nel trasporto del BDNF non sono attribuibili ad un danno al complesso motorio che regola il trasporto lungo i microtubuli. Per valutare che la discrepanza dei risultati nei due studi non fosse causata dall'utilizzo di modelli animali o di metodiche analitiche differenti, i ricercatori dell'Università di San Diego hanno provato a riprodurre l'esperimento presentato da Gauthier nel 2004, utilizzando gli stessi modelli e le stesse tecniche di analisi, ma senza ottenere alcuna conferma.

Come proposto da alcuni diversi autori, il trasporto del BDNF potrebbe essere alterato nell'HD a causa della presenza di aggregati di HTT mutata che vanno a costituire un vero e proprio ostacolo fisico al flusso (Chang *et al.*, 2006; Orr *et al.*, 2008).

Gli aggregati potrebbero anche determinare la precipitazione delle proteine motorie riducendone la forma solubile responsabile del trasporto (Gunawardena *et al.*, 2003; Trushina *et al.*, 2004).

Esistono quindi risultati contrastanti circa i meccanismi che soggiacciono all'alterazione del trasporto del BDNF e questo evidenzia la necessità di approfondire questo aspetto della patologia.

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO

5.1 Scopo della tesi

Sulla base di quanto esposto nei capitoli precedenti, il primo scopo di questa tesi è stato quello di valutare le possibili alterazioni dei livelli di OX plasmatica in un gruppo di pazienti con HD in relazione ad alcuni parametri e abilità neuropsicologiche. Pertanto, abbiamo misurato l'OX nel plasma di questi pazienti e di controlli sani prima (tempo t0) e dopo (tempo t1) la somministrazione di opportuni test di abilità cognitiva e sociale.

Mediante tale procedura si voleva cercare di evidenziare cambiamenti dei livelli del peptide in risposta agli stimoli provocati dai questionari e in relazione ai punteggi realizzati. A nostra conoscenza non vi sono studi simili nella letteratura corrente sulle basi neurochimiche della Còrea di Huntigton. Infine, lo scopo è stato anche quello di trovare eventuali correlazioni con la scala di valutazione clinica motoria UHDRS e altre caratteristiche demografiche, quali età, scolarità (grado di istruzione) ed età di esordio della malattia.

Il secondo scopo di questo studio è stato il rilevamento dei livelli piastrinici di BDNF nei medesimi soggetti. Infatti, se nella maggior

parte dei precedenti studi, sono state riportate variazioni dei livelli sierici o plasmatici di BDNF in soggetti stressati, con depressione e ansia (Kurita *et al.*, 2012 ; Autry and Monteggia 2012; Karege *et al.* 2005) e anche nella Corea (Zuccato *et al.* 2011), la quota presente all'interno delle piastrine è stata scarsamente considerata. Gli studi di Lee e Kim (2009) e Pandey *et al.* (2010) hanno confermato la riduzione dei livelli di BDNF osservata nel siero o plasma di pazienti con depressione maggiore valutando lo stesso parametro nelle piastrine. In realtà, la misura del BDNF nel plasma e nel siero come marker predittivo e di monitoraggio della HD è stata messa in discussione, a causa della scarsa robustezza del test e delle variabili sia individuali che dovute al campionamento, al tempo di separazione del plasma o del siero, tutti fattori che possono condizionare in modo considerevole il risultato finale (Zuccato *et al.*, 2011). Le piastrine, secondo uno studio pubblicato in “ the Journal of Neuroscience” nel 1990 effettuato da Hirotaka Y e Mark E. Gurney, sono il sito di maggior contenimento di BDNF nell'uomo e, quindi, il BDNF intrapiastrinico rappresenterebbe la quota principale in circolo mantenendone anche una riserva interna non rilasciabile (Yamamoto e Gurney, 1990; Fujimura *et al.*, 2002). Le piastrine liberano il BDNF durante la loro attivazione o in base a stimoli di varia natura. Il preciso ruolo fisiologico di questo rilascio non è stato totalmente chiarito, ma sembra che questo sia legato a processi di riparazione tissutale e soprattutto alla coagulazione ematica. Circa la provenienza del BDNF nelle piastrine esistono

dati contrastanti e questa non è stata ancora del tutto chiarita: alcuni autori riportano la presenza di RNA messaggero del BDNF nelle piastrine umane (Yamamoto e Gurney, 1990) mentre altri non confermano tale risultato sia nelle piastrine umane che in linee di differenziamento piastriniche (megacariociti) (Fujimura *et al.*, 2002). L'ipotesi attualmente più accreditata è quella che ritiene le piastrine non un sito di sintesi della neurotrofina in periferia ma solo di storage, accumulandola dal circolo e/o da altre sedi. Poiché le piastrine vengono considerate una “finestra” in periferia dell'attività neuronale attraverso meccanismi di comunicazione molecolare tra sistema nervoso e cellule in circolo (Maes, 1995; Cocchi et al 2012; Behari et al., 2013), l'utilizzo di questo modello periferico non invasivo potrebbe svelare alterazioni eventuali di tale canale neuroendocrino: il BDNF piastrinico potrebbe essere un marker più robusto e diretto delle patologie considerate rispetto al plasma e al siero, permettendo di valutare la quota totale della neurotrofina in circolo. Pertanto, in questa tesi, sono stati determinati anche i livelli piastrinici di BDNF nei pazienti e nei soggetti di controllo ma solo a livello basale (t0), prima dei test socio-cognitivi. Non si prevedevano infatti variazioni a breve termine a carico del BDNF piastrinico. In sostanza, lo scopo del nostro lavoro consisteva nel testare preliminarmente se l'OX plasmatica e il BDNF piastrinico potessero essere utilizzati come validi markers biochimici di questa invalidante patologia nel monitoraggio delle diverse fasi di malattia, del grado di

compromissione sociale e delle strategie terapeutiche in atto.

MATERIALI E METODI

6.1 Campionamento e prelievi

Il reclutamento dei soggetti è avvenuto presso gli ambulatori del Dipartimento di Medicina e Clinica Sperimentale dell'Università di Pisa, sezione di Neurologia. Nello studio sono stati inclusi in totale 12 pazienti affetti da HD (8 uomini, 4 donne) e 9 controlli (8 uomini, 1 donna), questi ultimi selezionati tra i pazienti afferenti al reparto di Neurologia per patologie non neurodegenerative. In Tabella 1, sono presentate le caratteristiche demografiche e cliniche (punteggio UHDRS) dei pazienti con HD mentre in Tabella 2 quelle solo demografiche dei soggetti di controllo.

I soggetti erano di età media comparabile, al di sopra di 45 anni; la discrepanza numerica tra soggetti di sesso maschile e femminile è stata bilanciata tramite il reclutamento di soggetti di sesso femminile in menopausa. Tutti i pazienti avevano sospeso la terapia in corso con neurolettici e/o antidepressivi almeno una settimana prima dello studio e i soggetti di sesso femminile non praticavano terapia ormonale sostitutiva.

In 8 dei 12 pazienti e in tutti i controlli, abbiamo effettuato 2 prelievi a distanza di circa un'ora e mezzo l'uno dall'altro. Tra i due prelievi è stato chiesto ad ognuno dei pazienti di compilare un questionario di screening e valutazione delle abilità di cognizione sociale, e della capacità a riconoscere alcune espressioni facciali

quali la paura e la tristezza. I test somministrati agli 8 pazienti erano seguiti da un neurologo e uno psicologo autorizzati e specializzati nella mansione.

| N° | Sesso | Punteggio UHDRS | Età esordio malattia | Età | Scolarità (anni) | Terapia (sospesa) |
|----|-------|-----------------|----------------------|-----|------------------|---|
| 1 | M | 33 | 52 | 57 | 13 | Amantadina |
| 2 | M | 50 | 59 | 77 | 5 | Mirtazapina, Tetrabenazina |
| 3 | M | 39 | 49 | 55 | 8 | Tetrabenazina, Valproato |
| 4 | M | 35 | 60 | 76 | 5 | Tetrabenazina, Valproato, Paroxetina |
| 5 | M | 29 | 36 | 47 | 13 | Pramipexolo |
| 6 | F | 28 | 58 | 60 | 5 | Amantadina, Valproato |
| 7 | M | 26 | 44 | 52 | 8 | Tetrabenazina, Valproato |
| 8 | M | 40 | 76 | 78 | 5 | Amantadina |
| 9 | F | 42 | 57 | 62 | 8 | Amantadina, Venlafaxina, Fluoxetina, Trazodone |
| 10 | F | 34 | 44 | 45 | 13 | Amantadina, Pregabalin |
| 11 | M | 55 | 43 | 52 | 13 | Tetrabenazina, Olanzapina, Sertralina |
| 12 | F | 29 | 72 | 72 | 8 | Trazodone |

Tabella 1: Caratteristiche demografiche e cliniche dei pazienti

| N | Sesso | Scolarità | Età |
|---|-------|-----------|-----|
| 1 | M | 13 | 71 |
| 2 | M | 13 | 58 |
| 3 | F | 5 | 66 |
| 4 | M | 5 | 68 |
| 5 | M | 5 | 69 |
| 6 | M | 5 | 75 |
| 7 | M | 13 | 45 |
| 8 | M | 8 | 73 |
| 9 | M | 5 | 78 |

Tabella 2: Caratteristiche demografiche della popolazione di controllo

Il primo prelievo è stato effettuato tra le 8 e le 9 di mattina (dopo una notte di digiuno), mentre il secondo intorno alle 10 sempre presso la Divisione Neurologica dell'Università di Pisa, in accordo a disposizioni e procedure descritte in dettaglio nel protocollo del progetto, letto e approvato dal Comitato Etico dell'Università di Pisa.

6.2 Valutazione clinica neuropsicologica

Agli 8 pazienti selezionati per le valutazioni cognitivo-sociali e i livelli plasmatici di OX, sono stati somministrati i questionari sempre subito dopo il prelievo basale (t0) e prima del prelievo post-test (t1).

Una prima batteria di test è stata utilizzata per valutare la capacità neuropsicologica dei pazienti e dei controlli tramite i seguenti questionari:

- Punteggio Mini Mental State Examination (MMSE) (**Folstein MF et al J Psychiatr Res 1975**): test che indaga lo stato cognitivo globale. Punteggio varia da 0-30.
- Punteggio alla Montreal Cognitive Assessment (MoCA) [**Nasreddine ZS et al I Am Geriatr Soc 2005**]: indaga 8 diversi domini cognitivi. Punteggio varia da 0-30.
- Punteggio Frontal Assessment Battery (FAB) [**Dubois B et al Neurology 2000**]: indaga sulla flessibilità mentale, programmazione motoria, sensibilità all'interferenza, controllo dell'inibizione e autonomia ambientale. Il punteggio varia da 0-18.
- Punteggio Test Intelligenza Breve (TIB) [**Sartori G et al 1997**]: questo test si basa sulla correlazione tra intelligenza generale e abilità di lettura.

Una seconda valutazione è invece consistita nell'indagine sulla capacità di cognizione sociale di tutti i soggetti.

I questionari e le scale utilizzate sono state:

- Punteggio al test “faux pas task” [**Stone VE et al J of Cog Neuroscience 1998**]: vengono proposte al paziente 10 storie, chiedendo di identificare comportamenti scorretti da parte di un soggetto A nei confronti del soggetto B.
- Riconoscimento dell'espressione dei volti secondo la scala Karolinska Directed Emotional Faces (KDEF): [**Lundqvist D et al CD ROM from Department of Clinical Neuroscience, Psychology section, Karolinska Institutet, ISBN 91-630-7164-9**] vengono proposte al paziente delle immagini di volti raffiguranti delle espressioni da riconoscere. Il punteggio varia da 0 a 28.

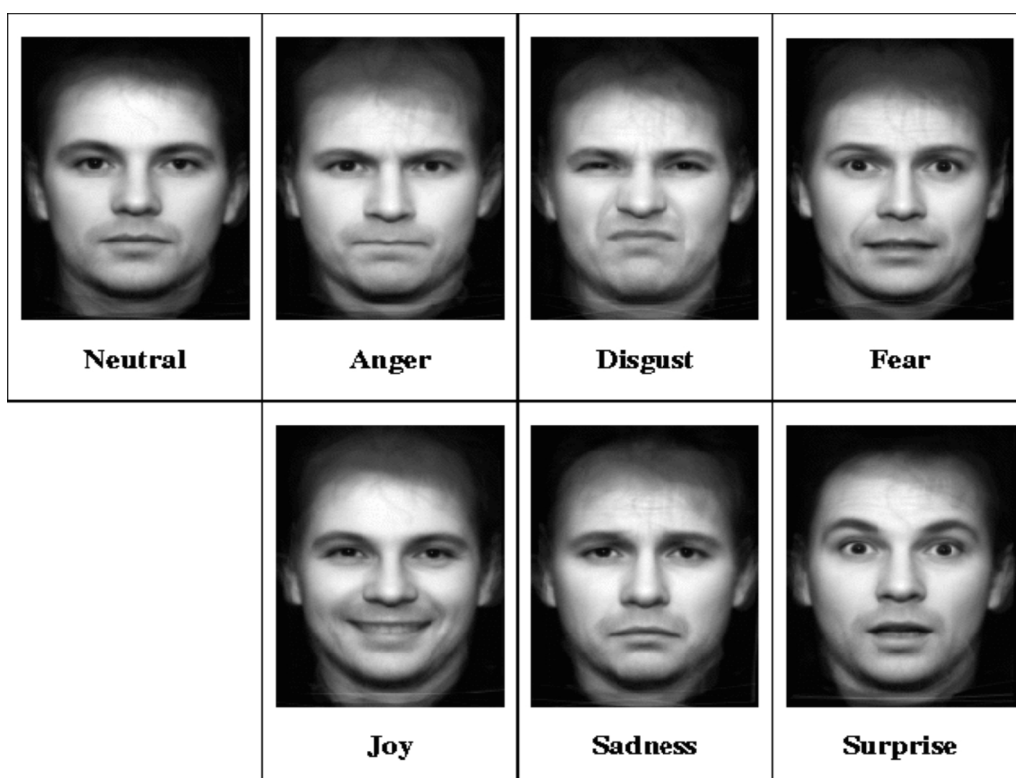


Illustrazione 17: Espressioni visionate dal paziente durante il test KDEF

- Punteggio al test di attribuzione delle emozioni mediante stimolo Verbale [**Prior M et al 2003** versione in italiano]: il test si propone di indagare l'abilità di attribuire stati emotivi ad altre persone. Il punteggio varia da 0-15.
- Punteggio al test "Strange Stories" [**Happé F et al 1999; Prior M et al 2003** versione in italiano]: test che consente di indagare la capacità del soggetto di immedesimarsi negli altri e comprenderne gli stati mentali. Il punteggio varia da 0-13.
- Punteggio alla Vignetta Wilhelm Bush [**Ioue Y et al 2004**], famoso caricaturista Tedesco del diciannovesimo secolo. Il test prevede comprensione del testo e deduzione tattica. Il punteggio varia da 0 a 4.

6.3 Prelievo ematico

Il prelievo di sangue venoso periferico, di circa 15 ml, è stato raccolto in provette contenenti EDTA (1mg/ml) e Aprotinina (1 mg/12 ml) e poi centrifugato a circa 200x g per 15-20 minuti a temperatura ambiente al fine di ottenere il plasma ricco di piastrine (PRP).

Il PRP è stato successivamente centrifugato a 2500 x g per 15 minuti a 4°C. Il sovranatante S₁, ossia il plasma, è stato raccolto e acidificato diluendolo 1:1(v:v) con HCl 0,1N per l'estrazione dell'OX.

Il pellet contenente le piastrine intere è stato congelato a -80°C per

il dosaggio del BDNF.

6.4 Estrazione dell'ossitocina dal plasma

Il plasma acidificato è stato centrifugato a 48,000 x g per 10 minuti a 4°C. In seguito a questa centrifugazione, il sovranatante S₂ è stato recuperato per l'estrazione dell'OX mediante una procedura in fase solida utilizzando cartucce C-18 tipo Sep-pak e un apparato sottovuoto a 24 postazioni, munito di manometro, come collettore dell'eluato (Waters, Vacuum manifold, Illustrazione 18). Le colonnine C18 (Strata X, 3 ml, Phenomenex) sono state previamente attivate con 10 ml di metanolo e 20 ml di acqua deionizzata e il campione (S₂) è stato successivamente caricato permettendo l'adesione dell'OX alla colonna.

Dopo un lavaggio con 10 ml di acido acetico al 4%, l'OX veniva staccata dalle cartucce C18 facendo eluire 2 ml di metanolo al 100%. Quindi l'eluato è stato portato a secco con una centrifuga-concentratore (Speedvac, Savant) munita di trappola di condensazione per vapori tossici. A fine operazione, gli essiccati sono stati conservati a -80°C fino al momento del dosaggio di determinazione dell'OX.

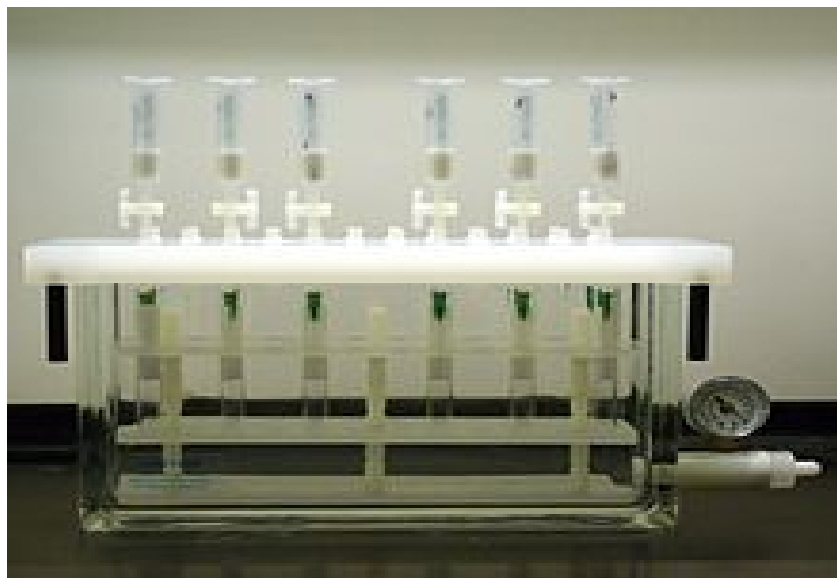


Illustrazione 18: Waters, Vacuum manifold

6.5 Dosaggio EIA dell'ossitocina plasmatica

Al momento del dosaggio, i campioni essiccati e conservati a -80° sono stati portati a temperatura ambiente e ripresi in 150 μ l di tampone di dosaggio, permettendo di concentrare notevolmente la quantità di OX presente nel plasma: infatti, in tal modo, i circa 6 ml di plasma, ottenuti dai 15 ml di sangue intero, venivano estratti e concentrati circa 1: 40 (v:v). Per la misura dei livelli plasmatici di OX è stato utilizzato un kit EIA (Enzyme ImmunoAssay) colorimetrico di tipo competitivo (Oxytocin Enzyme Immunoassay kit, Enzo Life Sciences). Il kit comprende una micro piastra a 96 pozzetti il cui fondo è rivestito di Anticorpo anti-IgG di capra anti-coniglio, ai quali si lega un Anticorpo specifico per OX presente nel kit.

Il kit, oltre a tutte le altre soluzioni e tamponi necessari, fornisce l'OX standard (10,000 pg/ml) da diluire per la retta di calibrazione (15.6-1000 pg/ml) e l'OX coniugata covalentemente all'enzima fosfatasi alcalina il quale, in presenza del substrato p-Nitrofenilfosfato (pNpp), catalizza la reazione di formazione del prodotto colorato di giallo p-Nitrofenolo. Successivamente, in pozzetti separati, sono stati aggiunti 100 μ l delle varie diluizioni della retta di calibrazione e dei campioni concentrati assieme a 50 μ l di OX coniugata e 50 μ l di anticorpo policlonale di coniglio anti-OX. In questo modo si realizza una competizione, per il legame al secondo anticorpo anti-OX, tra l'OX endogena non marcata a

contenuto incognito nel campione o l'OX a contenuto noto (retta di taratura, Illustrazione 19), e l'OX coniugata con l'enzima fosfatasi alcalina.

Dopo opportuna incubazione e lavaggi, è stato aggiunto il substrato della fosfatasi alcalina: la colorazione finale dovuta alla formazione del prodotto risulta quindi proporzionalmente inversa alla quantità di OX non marcata presente in ogni pozzetto, misurata a 405 nm mediante spettrofotometro Victor Wallac (Perkin Elmer). Dall'analisi della retta di calibrazione sono state estrapolate le concentrazioni incognite di OX nei campioni. Il kit è fornito di controlli di qualità interni per la valutazione di accuratezza e precisione del metodo; il metodo possiede una massima selettività (assenza di cross-reazioni con la vasopressina) ed è molto sensibile, potendo dosare quantità di OX pari a circa 12 pg/ml.

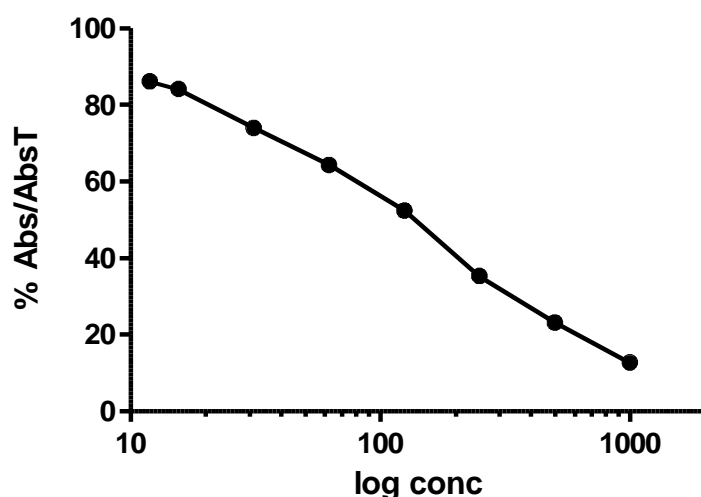


Illustrazione 19: Curva standard fornita dal kit

6.6 Trattamento e lisi delle piastrine per l'analisi del BDNF

Il giorno del dosaggio del BDNF, le piastrine conservate a -80°C sono state poste in ghiaccio e sono stati aggiunti 7,5 ml di tampone di lisi, 10 mM Tris-HCl, pH=8, contenente un mix di inibitori delle proteasi (Sigma Aldrich, Protease Inhibitor Cocktail, cod: P8340) diluito 1:1000-2000 (v:v). Le piastrine trattate sono state poi omogeneizzate mediante sonicatore (Sonics Vibracell) per 30-60 secondi al fine di provocare la rottura delle membrane plasmatiche delle piastrine mediante ultrasuoni. L'omogenato ottenuto è stato trasferito in provette eppendorf centrifugate mediante una centrifuga microfuge a velocità massima per 5 min.

Il pellet di membrane ottenuto è stato posto nuovamente a -80°C per altre analisi e valutazioni, mentre il sovranatante è stato preso ed utilizzato per il dosaggio del BDNF intrapiastrinico.

6.7 Dosaggio del BDNF con kit ELISA

Il dosaggio ELISA è un metodo specifico e sensibile per valutare la concentrazione di BDNF nel sovranatante di colture tissutali, nel plasma, nel siero, nelle urine e negli estratti tissutali.

ELISA è un acronimo derivato dall'espressione inglese Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (Saggio Immuno-Assorbente legato ad un Enzima). Si tratta di un versatile metodo d'analisi immunologica usato in biochimica per rilevare la presenza di una sostanza usando uno o più anticorpi ad uno dei quali è legato un enzima.

Per la determinazione dei livelli di BDNF abbiamo utilizzato un Kit ELISA della Promega che ci permette un'identificazione di tipo colorimetrico, il “BDNF Emax ImmunoAssay System”.

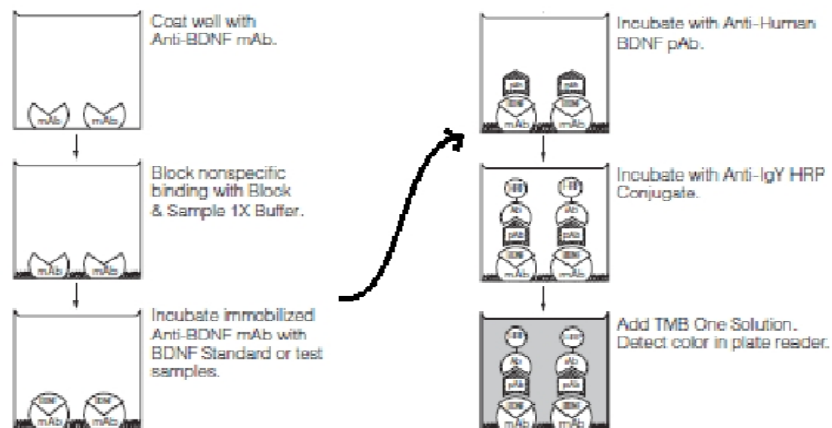


Illustrazione 20: Rappresentazione schematica della procedura del kit ELISA per determinazione del BDNF.

Questo metodo è stato messo a punto per la determinazione sensibile e specifica del BDNF utilizzando un sistema di anticorpi tipo sandwich (illustrazione 20).

In sostanza, al fondo in polistirene della piastra da 96 pozzetti viene fatto aderire, con una procedura detta di “coating” (rivestimento), un anticorpo monoclonale Anti-BDNF (mAb) che dovrà legarsi al BDNF presente sia negli standards a contenuto noto (retta di taratura) sia nel campione a contenuto incognito. Il BDNF catturato dall'mAb legato al fondo del pozzetto lega il secondo anticorpo specifico, l'anticorpo policlonale anti BDNF (pAb), che riconosce altri epitopi della molecola. Dopo opportuni lavaggi, la quantità di pAb legato in modo specifico, sarà determinata usando un terzo anticorpo anti-IgY specie-specifico, coniugato con un enzima, la perossidasi di rafano. Il coniugato non legato viene rimosso lavando la piastra e viene poi aggiunto il substrato della perossidasi contenente un gruppo cromogeno che si trasforma nel prodotto che conferisce un colore azzurro alla soluzione. Aggiungendo la soluzione di stop, HCl 0.1N, la soluzione da azzurra diventa gialla e viene letta allo spettrofotometro a 450nm. La quantità di BDNF sarà proporzionale al colore generato nella reazione enzimatica, una reazione di ossidoriduzione.

Questo test è in grado di identificare concentrazioni minime di BDNF (15,6 pg/ml) con un alto tasso di specificità (lega meno del 3% di sostanze non BDNF come NT-3, NT-4 e NGF).

6.8 Preparazione della piastra e procedura

Poiché lo scopo di questo studio era la determinazione della concentrazione di ormone BDNF presente all'interno delle piastrine, prima di dosare il BDNF in tutti i soggetti reclutati nello studio, abbiamo dovuto effettuare una prova per valutare la diluizione opportuna di sovrnatante di lisato piastrinico al fine di ottenere letture spettrofotometriche nella linearità della retta di taratura, quindi all'interno del range di valori della scala degli standards di BDNF fornita dal kit.

Per trovare la quantità giusta di campione da usare nel dosaggio, abbiamo quindi diluito l'omogenato piastrinico in rapporto 1:2, 1:4 e 1:8 (v:v) usando il tampone di dosaggio fornito dal kit. Il tampone consisteva in una soluzione contenente proteine per bloccare legami aspecifici alla piastra, il tampone "Block and Sample 1X buffer", ottenuto dalla diluizione 1:5 (v:v) in acqua distillata del tampone "Block and Sample 5X buffer" provvisto dal kit.

A seguito di questa prova, la diluizione ottimale del sovrnatante di lisato piastrinico è risultata pari a 1:8.

Per il test del BDNF sono state utilizzate le piastre a 96 pozzetti del tipo Nunc Maxisorp TM in polistirene, come consigliato dal protocollo, specifiche per dosaggi ELISA.

La realizzazione dell'intera procedura del kit prevedeva l'utilizzo di tre tipi di soluzioni tampone:

- 1) il tampone di “coating”, o soluzione di carbonato-bicarbonato a pH=9.7, il “**Carbonate Coating buffer**” contenente bicarbonato di sodio 0,025 M e carbonato di sodio 0,025M ;
- 2) il tampone di lavaggio o “**Washing buffer**” consistente in tampone 20 mM Tris-HCl, pH= 7.6, 150 mM NaCl, 0,05% detergente Tween 20;
- 3) il tampone “**Block and Sample Buffer 1X**” (vedi sopra).

La procedura di “coating” è una procedura standard per i dosaggi di tipo ELISA e consiste nell’incubazione di una notte, il giorno precedente al test, dell’anticorpo monoclonale mAb anti-BDNF in tampone carbonato-bicarbonato, pH=9,7-9,9, che consente l’adesione alla plastica della proteina . Dopo un lavaggio con il “Washing buffer”, sono stati aggiunti alla piastra 100 µl di tampone Block and Sample buffer 1X lasciato poi incubare per 1 ora a temperatura ambiente al fine di bloccare il legame aspecifico. Dopo 1 lavaggio sono stati aggiunti 100 µl delle diluizioni dello standard a contenuto noto di BDNF e dei sovrinatanti di omogenato piastrinico diluiti 1:8 in tampone Block and Sample buffer 1X. Poi è stato seguito il protocollo del kit e alla fine del test abbiamo ottenuto i valori di assorbanza a 450 nm utilizzando lo spettrofotometro Victor Wallac (Perkin Elmer) e li abbiamo confrontati con la retta standard fornita dal Kit (Illustrazione 21). Tali valori sono proporzionali al quantitativo di BDNF presente

all'interno del nostro campione.

La retta di calibrazione del kit è stata quindi ottenuta ponendo i valori di Abs a 450 nm sull'asse delle ordinate in funzione delle concentrazioni note di BDNF in pg/ml.

Dall'equazione sono stati ricavati i valori di BDNF in pg/ml contenuto nelle piastrine dei soggetti valutati.

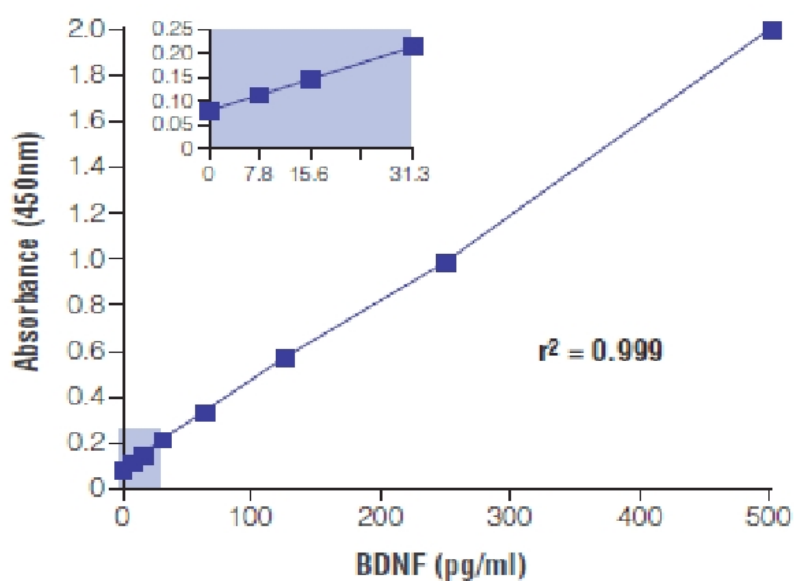


Illustrazione 21: Curva standard fornita dal kit ELISA Promega

6.9 Dosaggio proteico con metodo di Bradford

Poiché la quantità di piastrine ottenute è variabile da soggetto a soggetto, abbiamo rapportato i quantitativi di BDNF in pg/ml determinati con il kit ELISA, con la quantità di proteine totali presenti in ciascun campione piastrinico. A tale scopo abbiamo utilizzato la procedura di Bradford (Biorad). Il metodo è di semplice esecuzione ed è molto sensibile: consiste in un unico passaggio in cui il colorante viene aggiunto ai campioni diluiti in acqua distillata e andando subito a misurare l'assorbanza allo spettrofotometro a 595 nm.

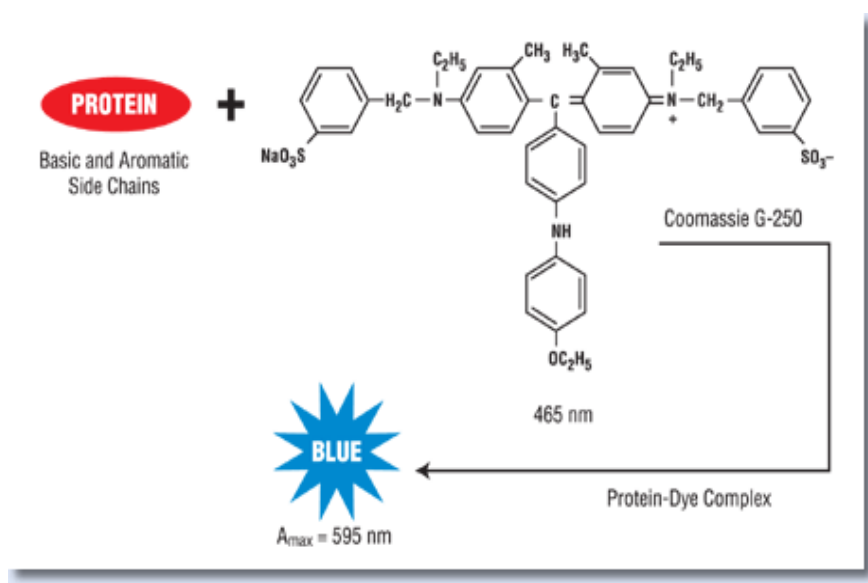


Illustrazione 22: Schematizzazione dell'attacco del Blue Coomassie alla proteina

Il legame del colorante *Coomassie Brilliant Blue G-250* alle proteine determina uno spostamento del massimo di assorbimento da 465 nm (rosso) a 595 nm (blu) in soluzioni acide. La formazione di complessi non covalenti con le proteine avviene tramite

interazioni elettrostatiche con amminoacidi basici (positivi) ed interazioni idrofobiche con amminoacidi aromatici.

La quantità di colorante che si lega è proporzionale alla quantità di proteina presente in soluzione, quindi l'intensità del colore blu (e dunque l'assorbimento) sarà anch'esso proporzionale alla concentrazione proteica. La retta di calibrazione viene effettuata utilizzando concentrazioni note di γ -globulina (Illustrazione 23).

I vantaggi di questo metodo sono: la semplicità di preparazione del reattivo e i tempi rapidi di esecuzione con sviluppo immediato della colorazione, la stabilità dei complessi che si formano e la sensibilità pari a circa 22 μ g/ml.

Di contro però si deve sottolineare che la quantità di colorante che lega le proteine dipende dal contenuto di amminoacidi basici, che molte proteine non sono solubili nella miscela di reazione acida, e che si potrebbero avere interferenze dovute a detergenti.

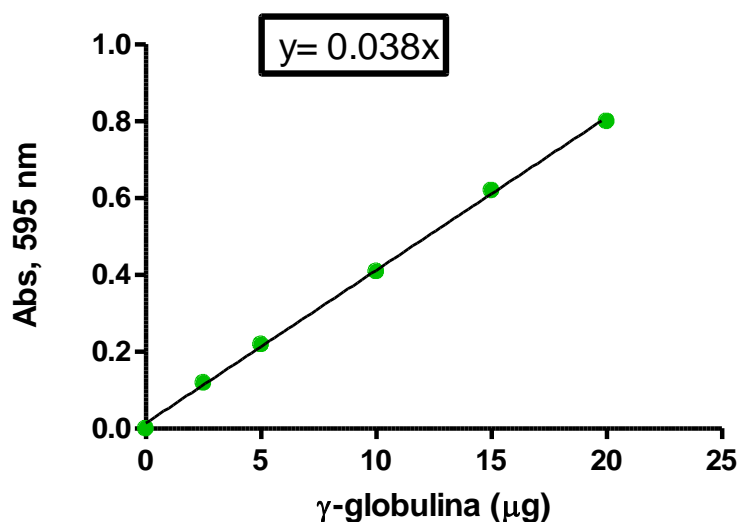


Illustrazione 23: Retta di calibrazione per il metodo di Bradford ottenuta con gamma-globulina

6.10 Analisi statistica

L'elaborazione dei dati e l'analisi statistica sono stati condotti mediante il software GraphPad Prism (versione 5.0, San Diego, CA, USA). I dati sono stati presentati come media \pm deviazione standard (DS). Per i confronti riguardanti i livelli di OX nei vari gruppi a confronto (pazienti e controlli e stessi soggetti al t0 e t1) sono stati utilizzati tests non parametrici, sia il test di Mann-Whitney per dati non appaiati sia il test di Wilcoxon per dati appaiati (test prima e dopo). Per il confronto dei livelli di BDNF intrapiastrinico tra pazienti e controlli a livello basale (t0, prima del test neuropsicologico), è stato utilizzato il *t*-test di Student, data la distribuzione normale di questo parametro. Successivamente, sono state condotte analisi di correlazione con le variabili individuali e cliniche mediante test di Spearman (non parametrico) per l'OX e di Pearson (parametrico) per il BDNF seguite da regressione lineare multipla. La soglia di significatività stabilita era $p = 0.05$, ammettendo l'ipotesi nulla per $p > 0.05$.

RISULTATI E DISCUSSIONE

7.1 Valutazione neuropsicologica

In Tabella 3, sono mostrati i dati riassuntivi (Media \pm DS) relativi ai punteggi ottenuti dalla valutazione clinica e psicologica dei 8 pazienti e 8 controlli. Dal confronto di questi punteggi nei due gruppi, mediante il test di Mann-Whitney, emerge che i pazienti affetti da HD presentano un'estesa compromissione sociale rappresentato dal valore significativamente ridotto della scala “faux-pas” (FP/FP e FP/C) e delle “strange stories” ($p < 0.01$).

| | <i>FAB</i> | <i>FP/FP</i> | <i>FP/C</i> | <i>KDEF/p aura</i> | <i>Str Stor</i> | <i>EV</i> | <i>EV/triste</i> |
|-------------------------|------------|--------------|-------------|------------------------|-----------------|-----------|------------------|
| <u>Pazienti</u> | | | | | | | |
| Media | 12.1 | 12.1 | 8.5 | 0.5 | 8.2 | 11.4 | 2.2 |
| DS | 2.8 | 10.9 | 2.3 | 0.5 | 3.2 | 1.3 | 0.5 |
| <u>Controlli</u> | | | | | | | |
| Media | 15.1 | 25.5 | 10 | 2.1 | 12.4 | 13.4 | 2.7 |
| DS | 2.1 | 2.3 | 0 | 0.9 | 0.7 | 1.2 | 0.6 |
| Mann-Whitney | 13.000 | 9.000 | 13.500 | 6.000 | 5.000 | 7.500 | 16.000 |
| Significatività | .024 | .009 | .007 | .003 | .002 | .005 | .027 |

Tabella 3: Confronto tra 9 pazienti e 9 controlli: valutazione socio-cognitiva.

Inoltre, i pazienti presentavano una peggiore percezione delle emozioni, mostrando maggiori difficoltà rispetto ai controlli nel riconoscere la paura dall'espressione dei volti e la tristezza a partire da emozioni verbali (scala KDEF, $p < 0.01$; scale EV ed EV/trist. $p < 0.01$). Tramite la correlazione non parametrica Spearman eseguita considerando tutti i soggetti (8 pazienti + 8 controlli), si è evidenziato che soggetti che presentano maggiore scolarità e minore età al momento dello studio raggiungono migliori risultati in particolare nel riconoscimento di rabbia, disgusto, tristezza e neutro

($p < 0.05$, $p < 0.01$). Analizzando controlli e pazienti separatamente è emerso che nei controlli sani vi è una correlazione positiva tra scolarità e riconoscimento della rabbia e della paura. Questa stessa indagine, condotta sulla popolazione di pazienti affetti da HD, ha confermato questo andamento.

In particolare, sono stati ottenuti dati sovrapponibili per quanto concerne la relazione tra scolarità e performance nel riconoscimento dei volti soprattutto per le espressioni di disgusto, tristezza e neutre ($p < 0.05$, $p < 0.01$). Questi dati depongono a favore quindi dell'impatto del grado di istruzione sulle abilità di elaborazione e percezione mentale.

Circa le correlazioni tra i parametri di malattia e performance dei tests nei pazienti, è emersa invece una correlazione negativa tra durata dall'insorgenza della malattia e i punteggi delle scale: pazienti con durata di malattia maggiore hanno punteggi più bassi, mentre pazienti con età di esordio più alta hanno una maggior capacità nel riconoscere la paura ($p < 0.05$, $p < 0.01$). Questo implica che nel tempo la patologia tende ad aggravare le condizioni cognitive e sociali dei pazienti.

7.2 Livelli ematici di ossitocina

Nelle Tabelle 3 e 4, sono riportati tutti i valori calcolati di OX plasmatica ottenuti. Se i confronti clinici hanno messo in evidenza delle notevoli differenze nella percezione di fatti ed emozioni, comparando i livelli ematici basali (t0) di OX nei due gruppi in studio è emersa solo una piccola differenza (Media \pm DS: 7.8 \pm 5.8 pg/ml controlli, 6.9 \pm 2.7 HD), che non ha raggiunto livelli di significatività al Test di Mann-Whitney (Illustrazione 24). Nell'illustrazione 25, invece, sono presentati i dati ottenuti al tempo t1, dopo i questionari. Anche in questo caso, non sono emerse differenze significative tra i due gruppi (Media \pm DS: 8.2 \pm 5.2 pg/ml controlli, 7.1 \pm 2.9, HD).

Questi risultati negativi potrebbero essere stati influenzati dalla notevole variabilità delle concentrazioni ematiche di OX e dall'esigua numerosità del campione esaminato. Quindi, sembrerebbe che i pazienti Còreici abbiano una certa tendenza ad avere livelli di OX circolante più bassi, ma questo aspetto necessita una conferma, estendendo lo studio ad un numero più elevato di soggetti o controllando maggiormente le variabili individuali.

| C T0 | HD T0 |
|----------|----------|
| 4,176049 | 9,4 |
| 4,71034 | 8,423085 |
| 5,79161 | 10,31127 |
| 16,97813 | 3,678315 |
| 18,7796 | 8,92784 |
| 6,662515 | 4,805207 |
| 7,292978 | 3,254878 |
| 4,71034 | 6,453437 |
| 2,626629 | |

Tabella 3 : Concentrazione di ossitocina (pg/ml) in pazienti (HD) e controlli (C) al T0

| C T1 | HD T1 |
|----------|----------|
| 6,251124 | 7,142857 |
| 4,040023 | 9,589158 |
| 5,412429 | 12,18957 |
| 17,82639 | 7,512433 |
| 16,58748 | 5,805531 |
| 6,341831 | 4,040023 |
| 6,135153 | 3,350025 |
| 5,210128 | 7,274379 |
| 5,801123 | |

Tabella 4: Concentrazioni di ossitocina (pg/ml) in pazienti e controlli al T1

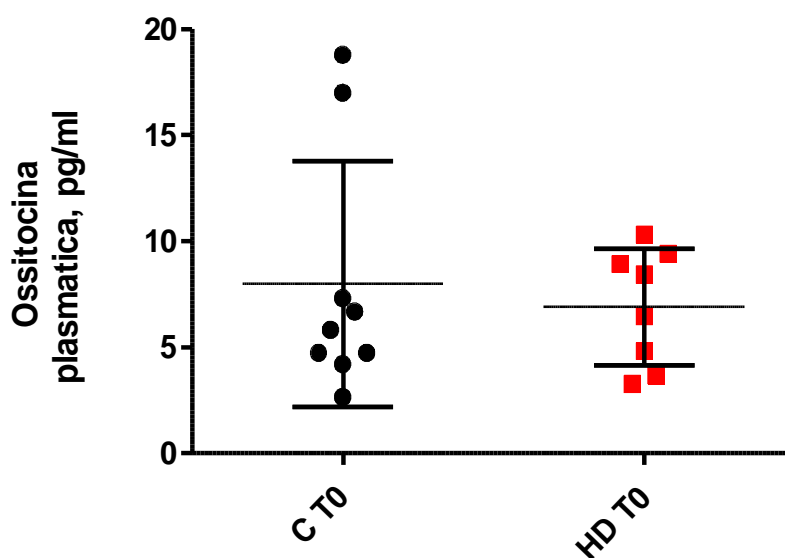


Illustrazione 24: Rappresentazione grafica dei livelli di ossitocina (pg/ml) in pazienti (HD) e controlli (C) al t0

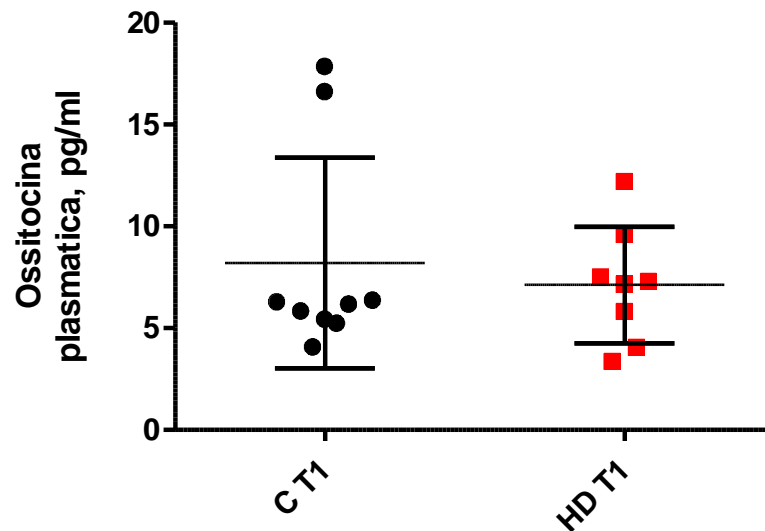


Illustrazione 25: Rappresentazione grafica dei livelli di ossitocina (pg/ml) in pazienti (HD) e controlli (C) al t1

Comparando pazienti (Illustrazione 27) e controlli (Illustrazione 26) (stessi soggetti) per i livelli di OX prima (t0) e dopo (t1) la somministrazione dei questionari, non abbiamo riscontrato alcuna differenza significativa nel rilascio di OX: Media \pm DS: 6.8 ± 2.6 pg/ml al t0 e 6.95 ± 2.72 al t1 nei pazienti con HD; Media \pm DS: 7.98 ± 5.8 pg/ml al t0 e 8.2 ± 5.2 al t1 nei controlli (test di Wilcoxon per dati appaiati, $p > 0.05$).

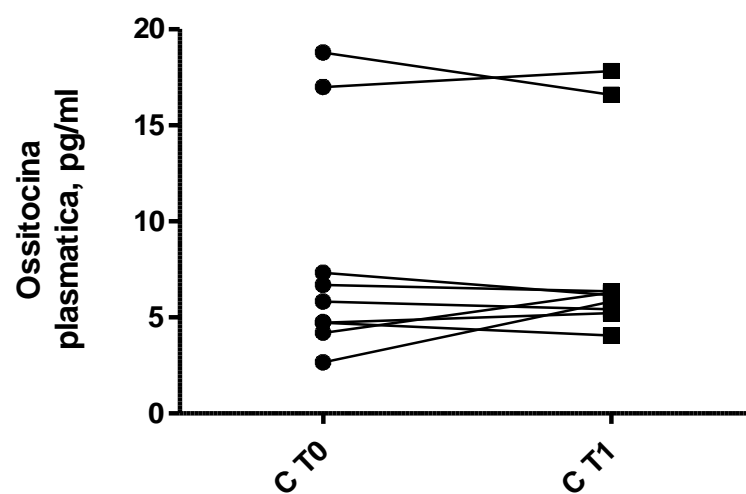


Illustrazione 26: Distribuzione dei livelli di ossitocina (pg/ml) dei controlli (C) al t0 e t1

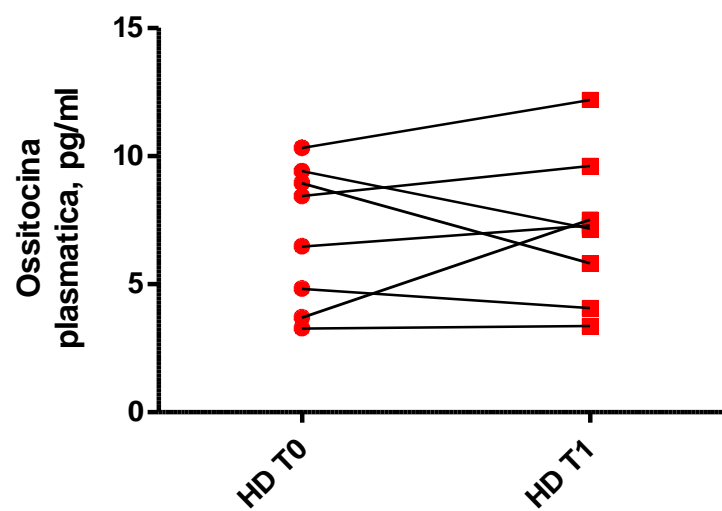


Illustrazione 27: Distribuzione dei livelli di ossitocina (pg/ml) dei pazienti (HD) al t0 e t1

I tests sembrano quindi non aver influenzato i livelli ematici di OX in tutti i soggetti esaminati. Anche in questo caso, si dovrebbe comunque estendere lo studio per confermare il dato.

Per evidenziare una possibile relazione tra OX e i punteggi della scala UHDRS nei pazienti, abbiamo effettuato una correlazione di Spearman riportando una tendenza verso una correlazione positiva dei livelli di OX plasmatica al t0 rispetto alla gravità della componente motoria del disturbo, senza raggiungere la significatività (Illustrazione 28). Al tempo t1, questa correlazione è diventata altamente significativa, $p=0.0072$ (Illustrazione 29). Questo risultato è di difficile interpretazione.

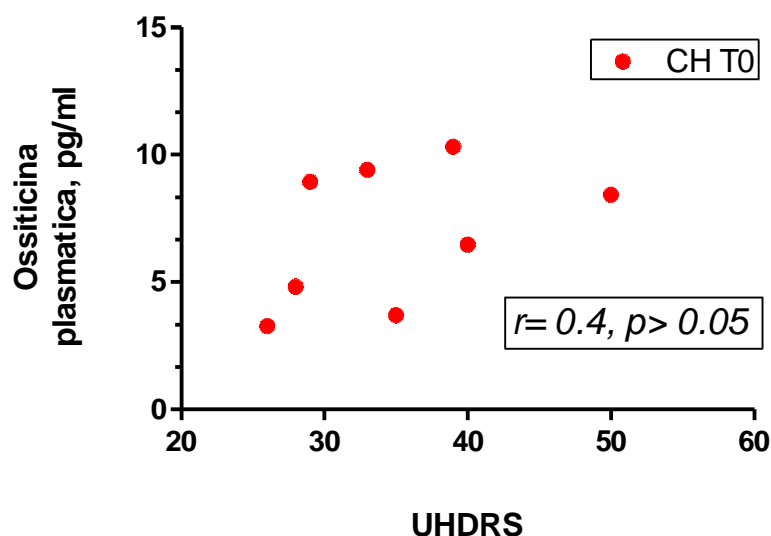


Illustrazione 28: Correlazione tra livelli plasmatici di ossitocina al t0 e valori scala UHDRS

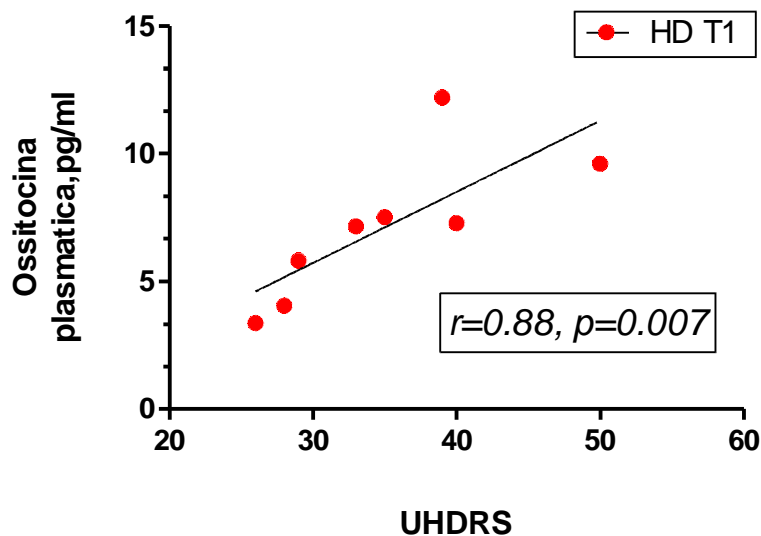


Illustrazione 29: Correlazione tra livelli plasmatici di ossitocina al t1 e valori scala UHDRS

Le correlazioni tra livelli circolanti di OX con età, età di esordio della malattia, durata di malattia e scolarità non sono risultate significative.

Riguardo alle correlazioni tra livelli di OX e scale di valutazione cognitivo-sociale, un risultato interessante qui ottenuto consiste nell'aver rilevato che i livelli basali di OX plasmatici nei soggetti sani spiegavano circa il 55% della variabilità dei risultati relativi al test di riconoscimento dei volti, mediante test di regressione lineare multipla ($r^2 = 0.55, p < 0.01$). Seppur limitata dalla numerosità del campione, tale relazione si mantiene anche analizzando il gruppo dei malati (regressione lineare significativa, $p < 0.05$). Quindi, questi dati confermano che la percezione delle emozioni dei volti si

correla positivamente con il rilascio di OX dalla neuroipofisi al circolo ematico.

7.3 Livelli intrapiastrinici di BDNF

I dati riguardanti il BDNF sono stati ottenuti tenendo in considerazione solamente il campione di sangue proveniente dal primo prelievo (t0).

Le tabelle 5 e 6 presentano i dati, calcolati tramite la retta di taratura, relativi ai valori di BDNF piastrinico in pg/ml nei (C) e nei pazienti (H), ottenuti dall'omogenato diluito 1:8. Questi stessi valori sono riportati come scatter plot nell'illustrazione 30.

| | pg/ml 1:8 |
|----|------------------|
| C1 | 434,1109 |
| C2 | 340,2726 |
| C3 | 293,6155 |
| C4 | 125,3356 |
| C5 | 400,5598 |
| C6 | 385,8812 |
| C7 | 414,7142 |
| C8 | 380,1146 |
| C9 | 428,8685 |

Tabella 6: BDNF piastrinico, pg/ml: diluizione 1:8 nei controlli.

| | pg/ml 1:8 |
|------|------------------|
| HD1 | 402,6567 |
| HD2 | 435,1594 |
| HD3 | 439,3533 |
| HD4 | 314,585 |
| HD5 | 428,3443 |
| HD6 | 403,7052 |
| HD7 | 439,8775 |
| HD8 | 388,5023 |
| HD9 | 373,8237 |
| HD10 | 441,4503 |
| HD11 | 381,163 |
| HD12 | 410,5203 |

Tabella 5: BDNF piastrinico, pg/ml: diluizione 1:8 nei pazienti

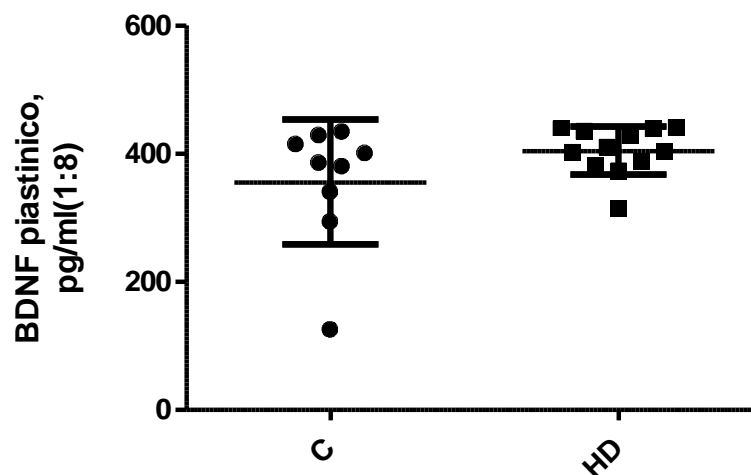


Illustrazione 30: Livelli di BDNF piastrinico (pg/ml) ottenuti con il kit. Diluizione 1:8

I valori riportati nelle prime due tabelle sono stati poi tutti corretti per il fattore di diluizione del sovrnatante di omogenato piastrinico ottenendo i valori riportati nelle tabelle 7 e 8 e nell'illustrazione 31.

| | pg/ml |
|----|----------|
| C1 | 3472,887 |
| C2 | 2722,181 |
| C3 | 2348,924 |
| C4 | 1002,685 |
| C5 | 3204,479 |
| C6 | 3087,05 |
| C7 | 3317,714 |
| C8 | 3040,917 |
| C9 | 3430,948 |

Tabella 7: BDNF piastrinico (pg/ml) dei controlli

| | pg/ml |
|------|----------|
| HD1 | 3221,254 |
| HD2 | 3481,275 |
| HD3 | 3514,826 |
| HD4 | 2516,68 |
| HD5 | 3426,754 |
| HD6 | 3229,642 |
| HD7 | 3519,02 |
| HD8 | 3108,018 |
| HD9 | 2990,59 |
| HD10 | 3531,602 |
| HD11 | 3049,304 |
| HD12 | 3284,162 |

Tabella 8: BDNF piastrinico (pg/ml) dei pazienti

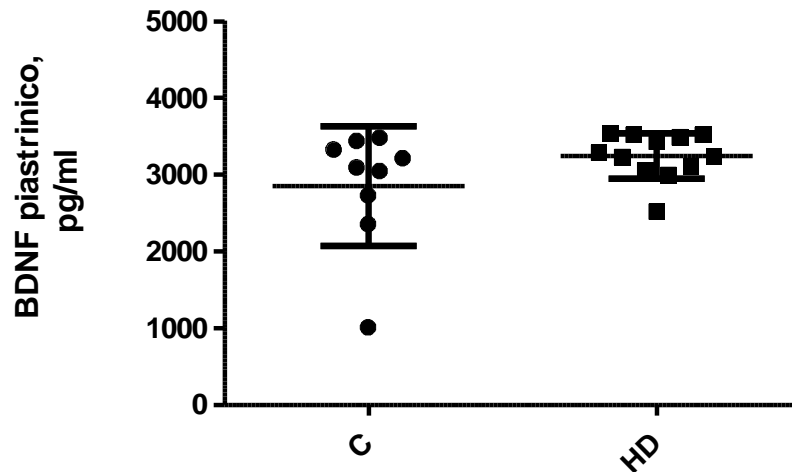


Illustrazione 31: Livelli di BDNF piastrinico (pg/ml) nei controlli (C) e nei pazienti (HD)

Come si può vedere dall'illustrazione 31, i valori ottenuti dai campioni dei pazienti sono leggermente maggiori rispetto ai valori dei controlli.

Tuttavia, per una misura più accurata del BDNF contenuto all'interno delle piastrine, tali dati sono stati poi tutti rapportati alla quantità di proteine totali contenute nel sovranatante piastrinico, considerando la notevole variabilità del numero di piastrine tra campioni di soggetti diversi. Dai pg/ml di BDNF abbiamo quindi ottenuto i pg di BDNF/mg di proteine totali riportati nelle tabelle 9 e 10.

| | pg/mg proteine tot. |
|----|---------------------|
| C1 | 2385,225 |
| C2 | 1050,629 |
| C3 | 2525,725 |
| C4 | 1261,239 |
| C5 | 2706,485 |
| C6 | 2243,495 |
| C7 | 3670,037 |
| C8 | 2058,847 |
| C9 | 4432,75 |

Tabella 9: Valori di BDNF (pg/mg di proteine) nei controlli

| | pg/mg proteine tot. |
|------|---------------------|
| HD1 | 3563,334 |
| HD2 | 4378,962 |
| HD3 | 3350,645 |
| HD4 | 3544,62 |
| HD5 | 3005,925 |
| HD6 | 2061,035 |
| HD7 | 3439,902 |
| HD8 | 2285,308 |
| HD9 | 2046,947 |
| HD10 | 3147,596 |
| HD11 | 2144,377 |
| HD12 | 2438,131 |

Tabella 10: Valori di BDNF (pg/mg di proteine) nei pazienti

Nell'illustrazione 32 vediamo espressi gli stessi valori sotto forma di scatter plot.

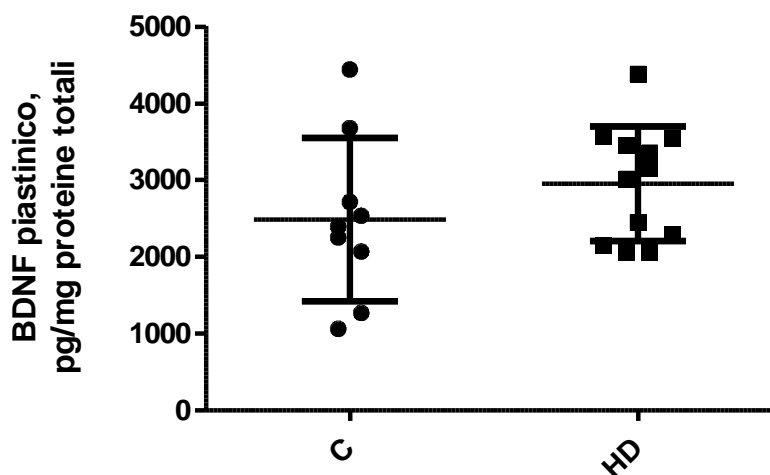


Illustrazione 32: Valori di BDNF (pg/mg di proteine) in pazienti (HD) e controlli (C)

Esprimendo i dati come pg/mg di proteine totali, le quantità medie di BDNF piastrinico riscontrate nei pazienti sono ancora leggermente superiori alle quantità medie di BDNF piastrinico dei controlli: Media \pm DS: 2482 \pm 1064 pg/mg proteine totali, controlli; Media \pm DS: 2951 \pm 749 , pazienti HD. Queste differenze non sono risultate significative (t -test: $p > 0.05$), probabilmente per la notevole dispersione dei dati, soprattutto nei controlli, e l'esiguo numero di pazienti e controlli a nostra disposizione.

Infine, le correlazioni Pearson tra i livelli piastrinici di BDNF e la scala UHDRS, età, scolarità ed età di esordio della malattia non sono risultate significative.

Una correlazione significativa e positiva è stata invece osservata tra i livelli di BDNF nei pazienti e la durata della malattia (Illustrazione 33).

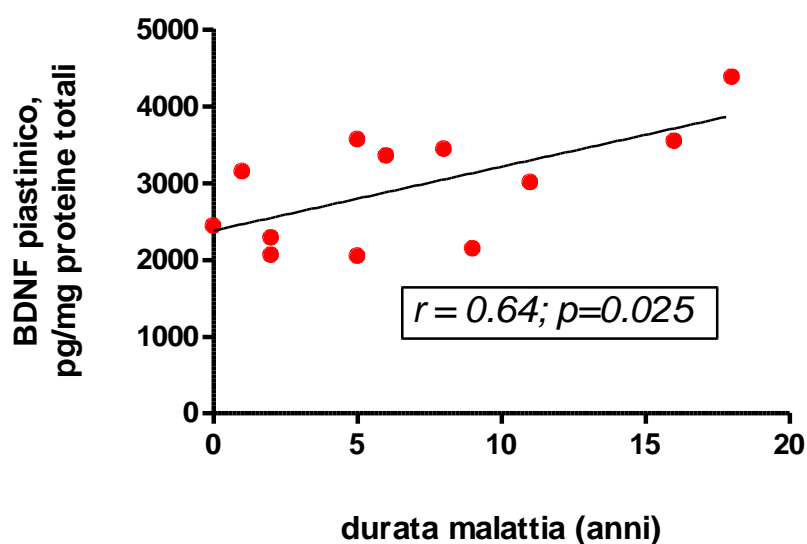


Illustrazione 33: Correlazione tra BDNF piastrinico (pg/mg prot. tot) e durata della malattia (anni)

Quindi possiamo affermare che, nel loro complesso, i nostri risultati confermano che le piastrine rappresentano una riserva di BDNF in circolo (Yamamoto e Gurney, 1990; Fujimura *et al.*, 2002; Pandey *et al.*, 2010; Serra-Millàs *et al.*, 2011). Nel siero, i livelli di BDNF si avvicinano più a quelli piastrinici, come osservato da diversi autori (Zuccato *et al.*, 2011; Ventriglia *et al.*, 2013). Dallo studio multicentrico di Zuccato *et al.*, (2011) sono emersi risultati contrastanti tra i gruppi di ricerca inglese e francese, rispetto a quello Italiano. In quest'ultimo infatti non è stata evidenziata alcuna differenza significativa tra i livelli di BDNF nei pazienti e nei controlli, mentre inglesi e francesi trovano un aumento significativo in plasma processato dopo due o quattro ore. Nel nostro studio abbiamo potuto osservare una correlazione positiva per quanto riguarda i livelli di BDNF e durata della malattia. Questo dato potrebbe risultare in accordo con quanto descritto da Zuccato nel 2011 riguardo ai gruppi Inglese e Francese. All'interno dello studio si può descrivere un generale aumento dei livelli circolanti di BDNF nei pazienti verso i controlli sani nella popolazione generale, che risulta ancora più marcato se confrontato con i livelli dei pazienti malati da molti anni. In sostanza, noi non siamo riusciti ad evidenziare differenze a carico di questo parametro perché circa il 42% dei pazienti da noi valutati risultavano malati da meno di 5 anni.

CONCLUSIONI

Questo lavoro mette in luce come i livelli di OX plasmatica siano collegati alla sfera cognitivo-sociale e alla capacità di percezione delle emozioni, un dato osservato sia nei controlli sani che nei pazienti. I pazienti con HD hanno rivelato una forte riduzione della performance nei test di valutazione neuropsicologica e, in particolare, i soggetti con minor istruzione e livelli di OX basali più bassi avevano ottenuto punteggi peggiori. Pur non avendo rilevato differenze significative tra pazienti e controlli, si può inoltre osservare un trend verso una minor concentrazione di OX plasmatica nei pazienti con HD. Inoltre, abbiamo riportato una tendenza verso la correlazione positiva tra i livelli plasmatici di OX basale e valutazione della scala UHDRS, correlazione che diviene fortemente significativa dopo la somministrazione dei tests neuropsicologici. Questo risultato non risulta tuttavia facilmente interpretabile, visto il numero così esiguo di soggetti sottoposti allo studio.

Per quanto riguarda i risultati ottenuti dall'analisi dell'altro parametro biochimico indagato, il BDNF piastrinico, presentiamo qui in modo preliminare una correlazione positiva tra i livelli di BDNF piastrinico e la durata di malattia, suggerendo l'influenza di questa variabile nel confronto statistico. Possiamo dire di aver osservato un trend all'aumento, che comunque non raggiunge i livelli di significatività. La presenza di maggiori livelli di BDNF

piastrinico nei pazienti con HD potrebbe essere giustificata da una modifica a livello proteico, causa di un eccessivo accumulo di BDNF, o da un difetto nel rilascio dello stesso. Solo ulteriori indagini potranno confermare e spiegare questi risultati.

Al termine dell'analisi, possiamo concludere suggerendo che sia i livelli di OX plasmatici che quelli di BDNF piastrinici, non rappresentano, almeno allo stato attuale dell'indagine, dei marcatori diretti della HD.

Le correlazioni qui osservate a carico dei due parametri, quelle relative ai sintomi e livelli di OX o quelle tra durata della malattia e concentrazioni di BDNF dovrebbero essere confermate ed ulteriormente indagate incrementando la numerosità dei soggetti. Infine, altri parametri neurochimici dovrebbero essere valutati in concomitanza.

Bibliografia

- Adolphs R. Curr Opin The neurobiology of social cognition. Neurobiol. 2001 Apr;11
- Aloyz R.S., Bamji S.X., Pozniak C.D., Toma J.G., Atwal J., Kaplan D.R., Miller F.D.(1998). p53 is essential for developmental neuron death as regulated by the TrkA and p75 neurotrophin receptors. J Cell Biol.;143(6):1691-703. [PMID:9852160]
- Altar, C.A., et al., Anterograde transport of brain-derived neurotrophic factor and its role in the brain. Nature, 1997. 389(6653): p. 856-60
- Altar, C.A., et al., Cell body infusions of brain- derived neurotrophic factor increase forebrain dopamine release and serotonin metabolism determined with in vivo microdialysis. Adv Pharmacol, 1998. 42: p. 915-21
- Apostol, B.L., et al., CEP-1347 reduces mutant huntingtin-associated neurotoxicity and restores BDNF levels in R6/2 mice. Mol Cell Neurosci. 2008 Sep. 39(1):8-20
- Autry Anita E. and Monteggia Lisa M. Brain Derived Neurotrophic Factor and neuropsychiatric disorders. 4 - 2012
- Balkowiec A., Katz D.M. (2000). Activity-dependent release of endogenous brain-derived neurotrophic factor from primary sensory neurons detected by ELISA in situ. J. Neurosci. 20, 7417–7423. [PMID: 11007900]
- Baquet, Z.C., J.A. Gorski, and K.R. Jones, Early striatal dendrite deficits followed by neuron loss with advanced age in the absence of anterograde cortical brain-derived neurotrophic factor. J Neurosci, 2004. 24(17): p. 4250-8.

- Barde Y.-A.(1990) The nerve growth factor family. *Prog. Growth Factor Res.* 2:237–348.
- Barde, Y.A., D. Edgar, and H. Thoenen, Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *Embo J*, 1982. 1(5): p. 549- 53.
- Bartels A, Zeki S.The neural basis of romantic love. *Neuroreport*. 2000 Nov 27
- Batchelor, P.E., et al., Activated macrophages and microglia induce dopaminergic sprouting in the injured striatum and express brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor. *J Neurosci*, 1999. 19(5): p. 1708-16.
- Behari M., Shrivastava M. Role of platelets in neurodegenerative diseases: a universal pathophysiology. *Pubmed* 2013 May;123(5):287-99. doi: 10.3109/00207454.2012.751534. Epub 2013 Feb 6.
- Bielsky IF, Young LJ Oxytocin, vasopressin, and social recognition in mammals..*Peptides*. 2004 Sep.
- Bruce AW, Donaldson IJ,Wood IC, Yerbury SA, Sadowski MI, Chapman M et al (2004) Genome-wide analysis of repressor element 1 silencing transcription factor/neuron-restrictive silencing factor (REST/NRSF) target genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:10458–10463.
- Canossa M., Griesbeck O., Berninger B., Campana G., Kolbeck R., Thoenen H.(1997). Neurotrophin release by neurotrophins: implications for activity-dependent neuronal plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 13279–13286.[PMID: 9371837]

- Cao Y, Gimpl G. A constitutively active pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) type I receptor shows enhanced photoaffinity labeling of its highly glycosylated form G. *Biochim Biophys Acta*. 2001 Jul 9
- Ceccatelli, S., et al., Expanded distribution of mRNA for nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, and neurotrophin 3 in the rat brain after colchicine treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. 88(22): p. 10352-6.
- Chang, D.T., et al., Mutant huntingtin aggregates impair mitochondrial movement and trafficking in cortical neurons. *Neurobiol Dis*, 2006. 22(2): p. 388-400
- Chaves VE, Tilelli CQ, Brito NA, Brito MN. Role of oxytocin in energy metabolism. *Peptides* 2013. 45: 9-14.
- Cocchi M., Tonello L., Gabrielli F. Consideration on Blood Platelets: A neuron's mirror for mood disorder?. *Oper journal of blood disease* 25/4/ 2012.
- Cohen S. purification of a nerve-growth promoting protein from the mouse salivary gland and its neuro-cytotoxic antiserum. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 46:302.11, 1960
- Davies SW. et al Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell* 1997; 90: 537–548
- Di Figlia, M., et al., Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic
- Dobrowsky RT, Jenkins GM, Hannun YA (1995) Neurotrophins induce sphingomyelin hydrolysis: modulation by co-expression of p75NTR with Trk receptors. *J Biol Chem* 270:22135–22142.

- Dugich-Djordjevic, M.M., et al., Immunohistochemical visualization of brain-derived neurotrophic factor in the rat brain. *Eur J Neurosci*, 1995. 7(9): p. 1831-9.
- Ferguson JN et al. Oxytocin in the medial amygdale is essential for social recognition in the mouse. *J Neurosci* 2001; 21: 8278-8285.
- Ferrer, I., et al., Brain-derived neurotrophic factor in Huntington disease. *Brain Res*, 2000. 866(1-2): p. 257-61.
- Frisen, J., et al., Characterization of glial trkB receptors: differential response to injury in the central and peripheral nervous systems. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. 90(11): p. 4971-5.
- Fujimura H, Altar CA, Chen R, Nakamura T, Nakahashi T, et al. (2002) Brain-derived neurotrophic factor is stored in human platelets and released by agonist stimulation. *Thromb Haemost* 87: 728–734.
- Fusco, F.R., et al., Co-localization of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and wild-type huntingtin in normal and quinolinic acid-lesioned rat brain. *Eur J Neurosci*, 2003. 18(5): p. 1093-102.
- Gauthier, L.R., et al., Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules. *Cell*, 2004. 118(1): p. 127-38.
- Goggi J, Pullar IA, Carney SL, et al : modulation of neurotransmitter release induced by brain-derived neurotrophic factor in rat brain striatal slices in vitro. *Brain Res* 941 (1-2) :34-42, 2002
- Goldman M et al. Diminished plasma oxytocin in schizophrenic patients with neuroendocrine dysfunction and emotional deficits. *Schizophrenia Res*. 2008; 98:247-255.

- Gray, J. M et al. Impaired recognition of disgust in Huntington's disease gene carriers. *Brain*, 1997; 120: 2029–2038.
- Gray, M., et al., Full-length human mutant huntingtin with a stable polyglutamine repeat can elicit progressive and selective neuropathogenesis in BACHD mice. *J Neurosci*, 2008. 28(24): p. 6182- 95.
- Griesbeck O., Canossa M., Campana G., Gartner A., Hoener M.C., Nawa H., Kolbeck R., Thoenen H. (1999). Are there differences between the secretion characteristics of NGF and BDNF? Implications for the modulatory role of neurotrophins in activity-dependent neuronal plasticity. *Microsc. Res. Technol.* 45, 262–275. [PMID: 10383119]
- Gunawardena, S., et al., Disruption of axonal transport by loss of huntingtin or expression of pathogenic polyQ proteins in *Drosophila*. *Neuron*, 2003. 40(1): p. 25-40.
- Gusella JF et al. A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature* 1983 Nov 17-23; 306 (5940): 234-8.
- Guzzi F, Zanchetta D, Cassoni P, Guzzi V, Francolini M, Parenti M, Chini B. Localization of the human oxytocin receptor in caveolin-1 enriched domains turns the receptor-mediated inhibition of cell growth into a proliferative response. Department of Experimental and Environmental Medicine and Medical Biotechnologies, University of Milano-Bicocca, 20052 Monza, Italy. *Oncogene*. 2002 Mar 7.
- Halban P.A., Irminger J.C. (1994). Sorting and processing of secretory proteins. *Biochem. J.* 299 (Pt 1), 1–18. [PMID: 8166626]
- Halliday GM et al. Regional specificity of brain atrophy in Huntington's disease. *Exp Neurol* 1998; 154: 663–72.
- Hamanoue M., Middleton G., Wyatt S., Jaffray E., Hay R.T., Davies A.M. (1999). p75-mediated NF-kappaB activation enhances the survival

response of developing sensory neurons to nerve growth factor. *Mol Cell Neurosci.*;14(1):28-40. [PMID: 10433815]

- Harmon A et al. Oxytocin inhibits aggression in female Syrian hamsters. *J Neuroendocrinol* 2002, 14:963-969.
- Harter C., Reinhard C. (2000). The secretory pathway from history to the state of the art. *Subcell Biochem.* 34, 1–38. [PMID: 10808330]
- Hayes, C.J. et al. Disgust and Huntington's disease. *Neuropsychologia* 2007; 45: 1135–1151
- Heerssen, H.M., M.F. Pazyra, and R.A. Segal, Dynein motors transport activated Trks to promote survival of target-dependent neurons. *Nat Neurosci*, 2004. 7(6): p. 596-604.
- Henley S. et al. Emotion recognition in Huntington's disease: a systematic review. *Neuroscience and Behavioural Reviews* 2012; 36:237-253.
- Henley, S.M. et al. Defective emotion recognition in early HD is neuropsychologically and anatomically generic. *Neuropsychologia* 2008; 46(8): 2152–2160.
- Her, L.S. and L.S. Goldstein, Enhanced sensitivity of striatal neurons to axonal transport defects induced by mutant huntingtin. *J Neurosci*, 2008. 28(50): p. 13662-72.
- Hirotsuka Y e Mark E. Gurney "the Journal of Neuroscience" November 1990, 10(11): 3469-3478.
- Hokfelt T., Broberger C., Xu Z.Q., Sergeyev V., Ubink R., Diez M. (2000). Neuropeptides-an overview. *Neuropharmacology* 39, 1337–1356. [PMID:10818251]
- Huntington Study Group (Kiebertz K, primary author). The Unified Huntington's Disease Rating Scale: Reliability and Consistency. *Mov Dis* 1996;11:136-142

- Insel T et al. Neuropeptides and the evolution of social behavior. *Curr Opin Neurobiol* 2000, 10:784-789.
- Johnson, R., et al., A microRNA-based gene dysregulation pathway in Huntington's disease. *Neurobiol Dis*, 2008. 29(3): p. 438-45.
- Johnson, S.A. et al . Beyond disgust: Impaired recognition of negative emotions prior to diagnosis in Huntington's disease. *Brain* 2007; 130: 1732–1744.
- Kaplan DR, Miller FD Neurotrophin signal transduction in the nervous system, *Curr Opin Neurobiol*. 2000 Jun;10(3):381-91
- Karege F., Vaudan G., Schwald M., Perroud N., La Harpe R. (2005) Neurotrophin levels in postmortem brains of suicide victims and the effects of antemortem diagnosis and psychotropic drugs. *Brain Res Mol Brain Res*.136: 29-37.
- Kavaliers M et al. Impaired discrimination of and aversion to parasitized male odors by female oxytocin knockout mice. *Gene Brain Behav* 2003; 2: 220-230.
- Keverne EB, Curley JP *Curr Opin Neurobiol.*; Vasopressin, oxytocin and social behaviour..Sub-department of Animal Behaviour, University of Cambridge, High Street, Madingley,Cambridge 2004 Dec.
- Kosfeld M, Heinrichs M, Zak PJ, Fischbacher U, Fehr E. *Nature*. Oxytocin increases trust in humans. University of Zurich, Institute for Empirical Research in Economics, Blumlisalpstrasse 10, CH-8006 Zurich, 2005 Jun 2;435(7042):673-6. Switzerland.
- Kurita M., Nishino S, Kato M, Numata Y, Sato T. Plasma Brain-Derived Neurotrophic Factor Levels Predict the Clinical Outcome of Depression Treatment in a Naturalistic Study. June, 2012 . *Plos one*
- Lang T., Bruns D., Wenzel D., Riedel D., Holroyd P., Thiele C., Jahn R. (2001).SNAREs are concentrated in cholesterol-dependent clusters that

definedocking and fusion sites for exocytosis. EMBO J. 20, 2202-2213.
[PMID:11331586.

- Lee BH, Kim YK (2009) Reduced platelet BDNF level in patients with major depression. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 33: 849-853.
- Lee, R., et al., Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. Science, 2001, 294(5548): p. 1945-8.
- Leibrock J1, Lottspeich F, Hohn A, Hofer M, Hengeler B, Masiakowski P, Thoenen H, Barde YA, Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor, Nature. 1989 Sep 14;341(6238):149-52.
- Lessmann, V., K. Gottmann, and M. Malsangio, Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. Prog Neurobiol, 2003. 69(5): p. 341- 74.
- Levi-Montalcini R, Meyer H & Hamburger V. In vitro experiments on the effects of mouse sarcomas 180 rmd 37 on the spinal and sympathetic ganglia of the chick embryo. Cancer Res 14:49-57, 1954. (70-0415, 78-0190, 79-1941, 80-0187)
- Lindholm, D., Role of neurotrophins in preventing glutamate induced neuronal cell death. J Neurol, 1994. 242(1 Suppl 1): p. S16-8.
- Mack SO, Kc P, Wu M, Coleman BR, Tolentino-Silva FP, Haxhiu MA.J Paraventricular oxytocin neurons are involved in neural modulation of breathing Appl Physiol. 2002 Feb
- Maes M., Evidence for an immune response in major depression: a review and hypothesis. Progress in Neuro-Psychopharmacology and biological psychiatry 1995, 11 - 38.
- Maggirwar S.B., Sarmiere P.D., Dewhurst S., Freeman R.S. (1998). Nerve growthfactor-dependent activation of NF-kappaB contributes to

survival of sympathetic neurons. *J Neurosci.*;18(24):10356-65. [PMID: 9852573]

- Marazziti D et al. A relationship between oxytocin and anxiety of romantic attachment. *Clin Pract Epidemiol Ment Health*, 2006; 2: 28
- Mazzoni I.E., Saïd F.A., Aloyz R., Miller F.D., Kaplan D. (1999). Ras regulates sympathetic neuron survival by suppressing the p53-mediated cell death pathway. *J Neurosci.*;19(22):9716-27. [PMID: 10559381]
- Merighi A. (2002). Costorage and coexistence of neuropeptides in the mammalian CNS. *Prog. Neurobiol.* 66, 161–190. [PMID: 11943450]
- Merighi A. (2002). Costorage and coexistence of neuropeptides in the mammalian CNS. *Prog. Neurobiol.* 66, 161–190. [PMID: 11943450]
- Modahl C et al. Plasma oxytocin levels in autistic children. *Biol. Psychiatry*, 1998; 43:270-277.
- Murer MG, Yan Q, Raisman-Vozari R (2001) Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 63:71–124
- Nakajima, K., et al., Neurotrophins regulate the function of cultured microglia. *Glia*, 1998. 24(3): p. 272-89.
- neurites in brain. *Science*, 1997. 277(5334): p. 1990-3.
- Orr, A.L., et al., N-terminal mutant huntingtin associates with mitochondria and impairs mitochondrial trafficking. *J Neurosci*, 2008. 28(11): p. 2783-92.
- Pan, W., et al., Transport of brain-derived neurotrophic factor across the blood-brain barrier. *Neuropharmacology*. 1998 Dec. 37(12):1553-1561.
- Pandey GN, Dwivedi Y, Rizavi HS, et al. (2010) Brain-derived neurotrophic factor gene and protein expression in pediatric and adult depressed subjects. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 34: 645-651.

- Paulsen JS et al Detection of Huntington's disease decades before diagnosis: the Predict-HD study. *J Neurol Psychiatry* 2008; 79 (8): 874-80.
- Pawson T., Nash P., Protein-protein interactions define specificity in signal trasduction. *Genes Dev.* 2000 May 1;14(9):1027-47
- Perutz MF, Johnson T, Suzuki M, et al. Glutamine repeats as polar zip-pers: Their possible role in inherited neurodegenerative diseases. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* 1994; 91: 5355-5358.
- Perutz MF, Johnson T, Suzuki M, Finch JT. Glutamine repeats as polar zippers: their possible role in inherited neurodegenerative dis-eases. *Proc Natl Acad Sci U S A.*1994 Jun 7;91(12):5355–5358.
- Pruunsild P, Kazantseva A, Aid T, Palm K, Timmusk T (2007) Dissect-ing the human BDNF locus: bidirectional transcription, complex splic-ing, and multiple promoters. *Genomics* 90:397–406
- Rasmussen A et al. Huntington disease in children: genotype– pheno-type correlation. *Neuropediatrics* 2000; 31: 190–194.
- Rita Levi Montalcini and Viktor Hamburger Stanley Cohen, department of zoology, Washington university, Anerve grwth-stimulating factor isolated from sarcomas 37 and 180, Communicated June 29, 1954
- Roback, J.D., et al., BDNF-activated signal transduction in rat cortical glial cells. *Eur J Neurosci*, 1995. 7(5): p. 849-62.
- Rosenfeld SJ, Kimball J, Vining D, Young NS, Intensive immunosup-pression with antithymocyte globulin and cyclosporine as treatment for severe acquired aplastic anemia, *Blood*. 1995 Jun 1;85(11):3058-65.
- Ross CA, Tabrizi SJ Huntington's disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment. *Lancet Neurol* 2011; 10: 83-98.
- Rothman, J.E. And Orci, L. (1992) Molecular dissection of the secret-ory pathway. *Nature*355: 409-415

- Rudge, J.S., et al., Neurotrophic factor receptors and their signal transduction capabilities in rat astrocytes. *Eur J Neurosci*, 1994. 6(5): p. 693-705.
- Savaskan E et al Post-learning intranasal oxytocin modulates human memory for facial identity. *Psychoneuroendocrinology* 2008; 33: 368–374.
- Schinder A.F., Berninger B., Poo M. (2000). Postsynaptic target specificity of neurotrophin induced presynaptic potentiation. *Neuron* 25, 151–163. [PMID:10707980]
- Schinder AF, Berninger B, Poo M : postsynaptic target specificity of neurotrophin-induced presynaptic potentiation. *Neuron* 25(1):151-163, 2002
- Seidah; N.G., Benjannet, S., Pareek, S, Savaria, D. Hamelin, J. Goulet, B., Laliberte, J., Lazureus, C., Chretien, M. and Murphy, R. A. (1996) cellular processing of the nerve growth factor precursor by the mammalian pro-protein convertases. *Biochem. J.*, 314: 951-960
- Serra-Millàs M, Lòpez-Vilchez I, Navarro V, Galàn A, Escolar G et al. (2011) Changes in plasma and platelet BDNF levels induced by S-citalopram in major depression. *Psychopharmacology* 216: 1-8.
- Siesling, S, van Vugt JPP, Zwindennan KAH, et al. Unified Huntington's Disease Rating Scale: A Follow Up. *Movement Disorders* 1998; 13: 915-919.
- Simmons, D.A., et al., Up-regulating BDNF with an ampakine rescues synaptic plasticity and memory in Huntington's disease knockin mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. 106(12): p. 4906-11.
- Sprengelmeyer R et al Loss of Disgust-perception of faces and emotions in Huntington's disease. *Brain* 1996; 119: 1647-1665.

- Storm EE, Tecott LH. Social circuits: peptidergic regulation of mammalian social behavior. *Neuron*. 2005 Aug 18
- Teixeira et al 2010 bdnf in neurodegenerative disorder
- Teng, H.K., et al., ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *J Neurosci*, 2005. 25(22): p. 5455-63.
- Trushina, E., et al., Mutant huntingtin impairs axonal trafficking in mammalian neurons in vivo and in vitro. *Mol Cell Biol*, 2004. 24(18): p. 8195-209
- Ventriglia MC, Zanardini R, Bonomini C et al. (2013) Serum brain-derived neurotrophic factor levels in different neurological diseases. *Biomed Res Int* 2013: 1-7.
- Vonsattel JPG. Huntington disease models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol* 2008; 115: 55–69.
- William F.(2001) *Fisiologia medica* Ed. Piccin.
- Yamamoto H, Gurney ME (1990) Human platelets contain brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci* 10: 3469-3478.
- Yoon SO, Casaccia-Bonofil P, Carter B., Chao MV (1998) Competitive signaling between TrkA and p75 nerve growth factor receptor determines cell survival. *J Neurosci* 18:3273-3281
- Young LJ, Wang Z. The neurobiology of pair bonding. *Nat Neurosci*. 2004 Oc
- Zuccato, C. and E. Cattaneo, Role of brain-derived neurotrophic factor in Huntington's disease. *Prog Neurobiol*, 2007. 81(5-6): p. 294-330.
- Zuccato, C., et al., Huntingtin interacts with REST/NRSF to modulate the transcription of NRSE-controlled neuronal genes. *Nat Genet*, 2003. 35(1): p. 76-83.

- Zuccato, C., et al., Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease. *Science*, 2001. 293(5529): p. 493-8.
- Zuccato, C., et al., Progressive loss of BDNF in a mouse model of Huntington's disease and rescue by BDNF delivery. *Pharmacol Res*, 2005. 52(2):133-9.
- Zuccato, C., et al., Systematic assessment of BDNF and its receptor levels in human cortices affected by Huntington's disease. *Brain Pathol*, 2008. 18(2): p. 225-38
- Zuccato C et al., (2011) Brain-derived neurotrophic factor in patients with Huntington's disease. *Plos-One* 6: 1-11.